



RESUMEN

“EVALUACIÓN DE LAS TÉCNICAS SWIM UP Y GRADIENTES DE DENSIDADES PARA LA CAPACITACIÓN ESPERMÁTICA EN LA CLÍNICA BioGEPA.”

La capacitancia espermática cumple un rol importante en las técnicas de reproducción asistida permitiendo la selección y adecuación de los espermatozoides que presenten las mejores condiciones para llevar a cabo la fertilización del ovocito; incluye varias técnicas: entre las principales empleadas en el ámbito de salud reproductiva de latinoamérica son “Gradientes de densidades y Swim Up”; que bajo diferentes fundamentos buscan el mismo cometido.

El propósito de este trabajo fue evaluar el desempeño de la técnica “Gradientes de densidades” frente a la “Swim Up”, en base al porcentaje de recuperación de espermatozoides con movilidad grado III; realizadas sobre muestras de semen provenientes de 28 pacientes que acudieron a la Clínica BioGEPA y que participaron en forma voluntaria en este proyecto.

La técnica “Gradientes de densidades” basada en el principio de sedimentación- centrifugación mostró mayor tasa de recuperación espermática con movilidad grado III que la técnica “Swim Up”, que está fundamentada en el desplazamiento de los espermatozoides a causa de la fuerza ejercida por el flagelo y las sustancias energéticas presentes en el medio.

Además se observó que de la concentración total de espermatozoides (grado 0, I, II, III), la técnica “Swim Up” recuperó espermatozoides de movilidad grado III con gran eficiencia (80-90%) y la de “gradientes de densidades” evidenció gran variabilidad en este parámetro con la presencia de altos porcentajes de espermatozoides de otros grados.



PALABRAS CLAVES

Semen

Espermatozoides

Movilidad grado III

Capacitancia espermática

Swim Up

Gradientes de densidades



TABLA DE CONTENIDO

DEDICATORIA.....	2
AGRADECIMIENTO.....	3
INTRODUCCIÓN.....	7
CAPÍTULO I	10
GENERALIDADES.....	10
1.1 INFERTILIDAD.....	10
1.1.1 CONCEPTO.....	10
1.1.2 INCIDENCIA.....	10
1.1.3 CAUSAS DE LA INFERTILIDAD.....	10
1.1.4 TENDENCIAS MUNDIALES.....	11
1.1.5 DIAGNÓSTICO.....	11
1.2 TECNOLOGÍA DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA.....	13
1.2.1 DEFINICIÓN.....	13
1.2.2 ASPECTOS GENERALES.....	13
1.2.3 CLASIFICACIÓN DE LOS TRATAMIENTOS DE INFERTILIDAD y/o ART.	14
1.2.3.1 INSEMINACIÓN ARTIFICIAL.....	16
1.2.3.2 FECUNDACIÓN IN VITRO.....	14
1.2.3.3 INYECCIÓN INTRA CITOPASMÁTICA.....	23
1.3 BASES FISIOLÓGICAS DE LA CAPACITACIÓN.....	25
1.3.1 TRACTO REPRODUCTIVO FEMENINO.....	25
1.3.2 EL SEMEN.....	28
1.3.2.1 PLASMA SEMINAL.....	28
1.3.2.2 EL ESPERMATOZOIDE.....	28
1.4 CAPACITACIÓN ESPERMÁTICA.....	35
1.4.1 GENERALIDADES.....	35
1.4.2 DEFINICIÓN.....	36
1.4.3 BASES MOLECULARES DE LA CAPACITACIÓN.....	37
1.5 MOTILIDAD DEL ESPERMATOZOIDE.....	42
1.5.1 FACTORES DESENCADENANTES DE LA MOVILIDAD.....	42
1.5.2 SECUENCIA DE ACTIVACIÓN E HIPERACTIVACIÓN DEL ESPERMA.....	43
1.5.3 CARACTERÍSTICAS DE LA CAPACITANCIA ESPERMÁTICA <i>in vitro</i>	45



1.5.4 CLASIFICACIÓN DE LOS MÉTODOS DE CAPACITANCIA ESPERMÁTICA.....	45
1.5.5 AGENTES CAPACITANTES E INDUCTORES DE LA REACCIÓN ACROSÓMICA IN VITRO.....	46
1.5.6 FACTORES QUE AFECTAN LA CAPACITACIÓN <i>IN VITRO</i>	49
CAPÍTULO II	51
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	51
2.1 HIPÓTESIS	51
2.2 OBJETIVOS	51
2.2.1 Objetivo general	51
2.2.2 Objetivos específicos	51
2.3 ENTREVISTA Y CONSENTIMIENTO	51
2.4 VARIABLES	52
2.5 MATERIALES Y MÉTODOS.....	52
2.5.1 MUESTREO	52
2.5.2 PRINCIPIOS DE LAS TÉCNICAS DE CAPACITANCIA	55
2.5.3 REACTIVOS.....	59
2.5.4 MATERIALES.....	59
2.5.5 PROCEDIMIENTOS DE LAS PRUEBAS	59
2.5.6 INTERPRETACIÓN DE LAS PRUEBAS	61
CAPÍTULO III	64
3. RESULTADOS y ANÁLISIS	63
3.1 RESULTADOS DE LA DETERMINACIÓN DE LABORATORIO.....	64
3.2 GRÁFICAS E INTERPRETACIONES DE LOS RESULTADOS.....	73
3.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	81
3.4 DISCUSIÓN	82
3.5 CONCLUSIONES.....	84
3.6 RECOMENDACIONES	86
4. BIBLIOGRAFÍA Y REFERENCIAS	87
ANEXOS	



UNIVERSIDAD DE CUENCA

UNIVERSIDAD DE CUENCA
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMÍCAS
ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

**“EVALUACIÓN DE LAS TÉCNICAS SWIM UP Y GRADIENTES DE
DENSIDADES PARA LA CAPACITACIÓN ESPERMÁTICA EN LA CLÍNICA
BioGEPA”**

**Tesis previa a la obtención del
Título de Bioquímica Farmacéutica**

AUTORA:

VERÓNICA ALEXANDRA AUQUILLA ORELLANA

DIRECTORA:

Dra. Yolanda Elizalde

ASESOR:

Dr. Fausto Zaruma

CUENCA-ECUADOR

2010 – 2011



DEDICATORIA

A Dios

Por darme vida y sabiduría para concluir exitosamente esta etapa más en mi carrera estudiantil.

A mis padres

Por ser ellos quienes con su amor, comprensión y sacrificio diario me han permitido crecer a lo largo de mi vida.

A familiares y amigos

Por brindarme momentos gratos y por la fé depositada en mi persona.

A Marcelo

Por el amor y la comprensión brindada durante todos estos años.



AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Director y al jefe de laboratorio de andrología de la clínica BioGEPA, por su colaboración en el proyecto, permitiéndome cumplir con la meta establecida.

Mi gratitud a la Doctora Yolanda Elizalde, Docente de la Escuela de Bioquímica y Farmacia de la Universidad de Cuenca, quien más allá de su esmero como directora de tesis me brindó su apoyo constante e incondicional.

A todas las personas que brindaron toda la ayuda para concluir exitosamente este proyecto de tesis.



INTRODUCCIÓN

La infertilidad es la incapacidad de tener descendencia debido a causas genéticas, anatómicas, fisiológicas, infecciosas, traumáticas, psicológicas, manifestadas en el hombre o la mujer. De acuerdo a varios estudios realizados, aproximadamente un 40% de los casos de infertilidad son causados por un factor masculino, 40% por un factor femenino y 20% por una combinación de ambos.^{1,2}

La medicina reproductiva tiene como finalidad ayudar a parejas infértiles a procrear, permitiéndole al médico elegir el mejor tratamiento. Gracias a los grandes avances de la ciencia, hoy en día se dispone de varios procedimientos que permiten hacerle frente a este problema, denominadas Técnicas de Reproducción Asistida (ART); dentro de las cuales podemos mencionar las siguientes: FIV (Fertilización in vitro), ICSI (Inyección intracitoplasmática con espermatozoide) e inseminaciones artificiales intrauterinas (IAI); las mismas que se realizan en una sola ocasión por ciclo reproductivo de la mujer, en la pareja infértil. Cabe mencionar que para dichos procedimientos es de vital importancia realizar una capacitación espermática con el objeto de concentrar espermatozoides de excelente calidad, para lo cual se han creado varias técnicas fundamentadas en aspectos fisiológicos de la migración de gametos, su interacción con el tracto genital femenino y la fecundación. Siendo los más empleados el "Swim up" y "Gradientes de densidades".

Existen varios estudios que han evaluado los diferentes métodos de capacitación para establecer el más adecuado *in vitro*, pero estos revelan una variada controversia en los resultados obtenidos, por lo que algunos centros optan por realizar su propio estudio acerca de estos métodos y adecuarlos a su realidad para posterior aplicación. Así la clínica BioGEPA al ser un ente que busca la excelencia, al mando de sus directivos ha visto la necesidad de plantear un estudio sobre qué técnica(s) de capacitación aplicar en esta dependencia para mejorar su tasa de embarazo.

El propósito de este trabajo es evaluar las técnicas mencionadas en un total de 28 muestras de semen y definir aquella que nos brinde resultados satisfactorios



de recuperación de espermatozoides, que conjuntamente con el tratamiento necesario permitan alcanzar los objetivos esperados por la pareja, que es el nacimiento de un niño y, los de la clínica BioGEPA que son: a) Mayor enfoque al establecer el método más apropiado para cada caso y, b) Proporcionar una fracción de información trascendental (protocolos de procedimientos de las diferentes técnicas) en la elaboración del "Manual del Laboratorio de Andrología".



CAPITULO I

GENERALIDADES

1.1 INFERTILIDAD

1.1.1 CONCEPTO

La infertilidad se ha definido como la incapacidad de la pareja de lograr una gestación que lleve al nacimiento de un hijo, después de un año de mantener relaciones sexuales sin métodos de planificación.¹

1.1.2 INCIDENCIA

Según la OMS: "La infertilidad afecta a más de 80 millones de personas en todo el mundo. En general una de cada 10 parejas experimentan infertilidad primaria o secundaria, pero ellas viven en países en desarrollo, donde los servicios de infertilidad en general y ART en particular, no están disponibles."²

En nuestro medio existen limitaciones para precisar la verdadera incidencia de infertilidad, pero hay datos que hacen suponer que el 15 al 30% es una cifra que se aproxima a la realidad y que ésta tiende a incrementarse en los países en vías de desarrollo.³

1.1.3 CAUSAS DE LA INFERTILIDAD

FACTOR FEMENINO	FACTOR MASCULINO
Problemas genéticos, edad de la mujer, moco cervical hostil. Trastornos ovulatorios Obstrucción del oviducto Inmunidad a espermatozoides. Síndrome de ovario poliquístico Endometriosis, endometritis.	Varicocele, Disgenesia ,Criptorquidia, Radioterapia, Hipogonadismo, lesiones Testiculares Hipotrofia testicular Disfunciones hormonales Infección del tracto seminal (<i>Neisseria gonorrhoeae</i> , <i>Herpes Simple II</i> , <i>HIV</i>) Anticuerpos anti-espermáticos. Exposición a pesticidas

¹ VANRELL Joan Antoni, CALAF Joaquín, BALASCH Joan, VISCASILLAS Peren (1992), "Fertilidad y Esterilidad Humanas". Ediciones Científicas y Técnicas, Barcelona- España; cap 1

² HORTON Marcos (2007); "Curso Superior Reproducción Humana" EPIDEMIOLOGIA DE LA INFERTILIDAD. Disponible en: [http://www. EPIDEMIOLOGIA DE LA INFERTILIDAD pdf. SAMeR](http://www.EPIDEMIOLOGIA DE LA INFERTILIDAD pdf. SAMeR) [23 /06/10]

³ VALENCIA Iván (2002), Infertilidad, "Tratado de Reproducción Humana" Editorial Masson -Elsevier, España. Disponible en: Http://www.redlara.com/esp/PEC_DAT_LIVRO_IVAN_INDICE.ASP [23/07/10].



Enfermedad inflamatoria pélvica Obesidad, infección tracto genital (<i>Chlamidya trachomatis</i> , <i>t. vaginalis</i>), Hábitos tóxicos, etc.	(<i>dibromocloropropano</i>) Tratamientos con quimioterapéuticos, antioncológicos Hábitos tóxicos, Exposición a metales pesados (<i>Cd</i> , <i>Pb</i> , <i>Mg</i>). etc.
---	---

Tabla N° 1. Factores de infertilidad. ^{1,2}

1.1.4 TENDENCIAS MUNDIALES

Hoy en día existen tendencias mundiales que nos conducen a un incremento de la infertilidad como son:

- Incremento de hábitos tóxicos.
- Cambio en la edad reproductiva consecuencia de la educación sexual.
- Fácil acceso y comportamiento anticonceptivo en países industrializados.
- Adelanto de la anticoncepción definitiva como método de planificación familiar.
- Control de natalidad.
- Incremento de abortos espontáneos debidas a enfermedades de transmisión sexual, Influencia ambiental, etc
- Retraso de la primera concepción por incorporación de la mujer en el ámbito laboral ^{2, 4, 5}

1.1.5 DIAGNÓSTICO

El estudio de infertilidad femenina precisa diversas exploraciones especiales como: laparoscopia diagnóstica quirúrgica, histeroscopia ofical, ecografías, etc.

El examen más simple para determinar infertilidad masculina es el espermograma, pues si este es perfectamente normal, el estudio se focalizará en la mujer. En gran porcentaje se requiere para el diagnóstico la capacitancia espermática como examen suplementario.

⁴ VALENCIA Iván (2002), Aspectos clínicos de la infertilidad. "Reproducción Humana e Infertilidad" Quito: Imp. Boutique Creativa. Noviembre. Cap, 1 y 2

⁵ URBINA, LERNER, BIBER (2008), "Fertilidad y Reproducción Asistida". Editorial Panamericana, Caracas–Venezuela, cap 9 -17.



En ambos casos es necesario complementar con exámenes de sangre. (Hormonas).⁶

1.1.5.1 ESPERMOGRAMA

El espermograma es el examen que brinda la visión más amplia de la capacidad reproductiva del varón, su costo es bajo, permite obtener una primera impresión diagnóstica y orienta el protocolo de estudio ó tratamiento a seguirse.

Comprende:

- Evaluación de características fisicoquímicas (volumen, aspecto, pH, viscosidad).
- Aspectos citomorfológicos (concentración, movilidad, morfología, aglutinación, presencia de leucocitos, eritrocitos, células germinales inmaduras, debris, etc.)
- Estudios microbiológicos y marcadores glandulares.^{7, 8}

1.1.5.1.1 VALORES DE REFERENCIA DE LOS PARÁMETROS SEMINALES (OMS, 1999)⁸

Volumen	≥ 2 a 5.5 ml
PH	≥ 7.2-7.8
Concentración	≥ 20 x 10 ⁶ /ml
Número total de espermatozoides	≥ 40 x 10 ⁶ / eyaculación
Movilidad	≥ 50%a+b o ≥ 25 %a
Morfología	*≥ 50 espermatozoides morfológicamente

⁶ URBINA, LERNER, BIBER (2008). "Fertilidad y Reproducción Asistida". Editorial Panamericana, Caracas-Venezuela, pág 18-40.

⁷ Instituto Márquez (2003), Factores para valorar el semen. Factores para valorar el semen. Disponible en http://www.institutomarques.com/estudio_semen_factores.html [23/07/2010]

⁸ OMS .Cambridge University Press (1994). "Manual de Laboratorio de la OMS para el examen del semen humano y de la interacción entre el semen y el moco cervical". Editorial Médica Panamericana S.A, 3ª edición. Buenos Aires.



	normales.
Viabilidad	$\geq 75\%$ vivos (no se colorean)
Leucocitos	$< 1 \times 10^6/\text{ml}$

Tabla N° 2. Valores de referencia de los parámetros seminales.

1.2 TECNOLOGÍA DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA

1.2.1 DEFINICIÓN

La tecnología de reproducción asistida consiste en auxiliar, transformar o sustituir procesos destinados a suceder espontáneamente en el aparato genital femenino por medio de una manipulación ginecológica.¹

1.2.2 ASPECTOS GENERALES

Nació en los últimos cuarenta años, ha crecido y evolucionado de la mano de otras innovaciones tecnológicas, con la visión, misión de intentar solventar el amplio abanico de causas que llevan a la infertilidad a una pareja. Gracias a ellas, las posibilidades de éxito en los tratamientos, crece considerablemente.^{5,6}

Incluye procedimientos estandarizados que se llevan a cabo en laboratorios altamente especializados con tecnología de punta, donde se manipulan óvulos, espermatozoides para optimizar su capacidad fecundante y embriones que se cultivan para mejorar su implantación; siguiendo rigurosas normas de seguridad e higiene, y apoyado en medios de cultivo, equipos y materiales diseñados exclusivamente para este fin.^{9,12}

Involucran los siguientes procesos:

- Evaluación, obtención, preparación y conservación de los gametos.
- Fecundación del ovocito por el espermatozoide (*in vivo* ó *in vitro*).
- Transferencia de gametos, embriones al interior de la paciente.^{9,10}

⁹Fertilización – Cultek. Disponible en

http://www.cultek.com/aplicaciones.asp?p=Aplicacion_FIV_DGP&opc=introduccion [21/08/10]

¹⁰ URBINA, LERNER, BIBER (2008). "Fertilidad y Reproducción Asistida". Editorial Panamericana, Caracas-Venezuela, cap 32,33,34.



Como requisito legal la pareja debe firmar un consentimiento específico de la técnica de "Reproducción Asistida" que se van a realizar; certificando que han sido informados correctamente de los aspectos médicos, biológicos, jurídicos, éticos y económicos, que los entienden y aceptan.¹¹

1.2.3 CLASIFICACIÓN DE LOS TRATAMIENTOS DE INFERTILIDAD y/o ART.

BAJA COMPLEJIDAD: La fecundación ocurre dentro del seno materno.

- Coito dirigido
- Inseminación

ALTA COMPLEJIDAD: La fecundación ocurre fuera del seno materno

- FIV: fecundación in Vitro
- ICSI: Inyección intracitoplasmática con espermatozoide.

Tabla N°3. Clasificación de las técnicas de reproducción asistida

Las técnicas que se llevan a cabo en el laboratorio son: inseminación artificial intrauterina, FIV, ICSI, las mismas que van a ser descritas en mi estudio.^{12,13}

1.2.3.1 INSEMINACIÓN ARTIFICIAL

DEFINICIÓN

La inseminación artificial es el depósito no natural de espermatozoides capacitados, en el tracto reproductivo de la mujer; con el fin de facilitar el encuentro natural de los gametos y conseguir una gestación.¹⁰

CLASIFICACIÓN

La inseminación se considera homóloga, cuando se emplea el semen del esposo y heteróloga si el semen corresponde a un donante.

OBJETIVOS

- Acercar los espermatozoides al óvulo, en el aparato genital femenino.

¹¹ HONORABLE CÁMARA DE DIPUTADOS DE LA NACIÓN. (2010) "Accesibilidad y regulación de las técnicas de reproducción humana asistida", Buenos Aires. Disponible en [www. xxxx-D-2010-reproduccionhumanaasistida.pdf](http://www.xxxx-D-2010-reproduccionhumanaasistida.pdf) [23/07/10].

¹² SABINA DE VICENTIIS. Manual de procedimientos del Laboratorio de Reproducción Asistida. Buenos Aires: CEGYR.

¹³ URBINA, LERNER, BIBER (2008). "Fertilidad y Reproducción Asistida". Editorial Panamericana, Caracas-Venezuela, cap 30,31,32.



- Mejorar e incrementar el potencial de fertilidad de los espermatozoides realizando una serie de procedimientos de laboratorio al producto eyaculado, llamados en conjunto capacitación espermática.

CICLO DE LA INSEMINACIÓN ARTIFICIAL

El ciclo de inseminación intrauterina artificial consta de las siguientes fases:

a. Estimulación ovárica

Consiste en inducir una ovulación múltiple mediante medicaciones hormonales. Durante el ciclo menstrual espontáneo inician su desarrollo muchos folículos dentro de cada ovario, pero cuando uno de ellos alcanza un tamaño mayor se produce una inhibición del crecimiento de los demás. Con el tratamiento se intenta desarrollar hasta la madurez completa 1 a 4 folículos. El tiempo habitual que dura esta fase es de 11-13 días. La pauta de medicación se basa principalmente en la edad de la paciente, morfología de los ovarios, analítica hormonal, masa corporal y respuesta a la estimulación en ciclos previos si los ha habido. Cuando los folículos han alcanzado un tamaño superior a 20 mm de diámetro se indica la inyección de β -HCG, esta hormona promueve los últimos cambios madurativos y la ovulación.

b. Inseminación artificial

La inseminación tiene que sincronizarse con la ovulación (debe de hacerse pasadas pocas horas); si ya ha transcurrido 24 horas después de la ovulación ó el semen llega 24 horas antes de la misma, es más difícil que se logre el objetivo. Para ello se coloca a la mujer en posición ginecológica e introduce un espéculo vaginal estéril para localizar el cervix. La muestra de semen capacitada y lista para la inseminación se ubica en una fina cánula (catéter) conectada a una jeringa. Por el orificio del cérvix se introduce el catéter que ingresa por vía vaginal, se deposita un número relativamente grande de espermatozoides capacitados (4'.000.000 aproximadamente), en el interior del útero de la mujer pasando por alto el cuello uterino para tener acceso directo a las trompas de Falopio; luego se retira lentamente el catéter y se deja a la paciente en reposo; a los pocos minutos estos ya habrán llegado a las trompas donde está el ovocito esperándolos para llevar a cabo la fertilización.



c. Fase lútea

Finalizado la inseminación, la paciente debe colocarse óvulos de progesterona como suplemento hormonal, todos los días durante dos semanas con el fin de mejorar las condiciones del endometrio para la implantación embrionaria.^{14,15}

APLICACIONES

Esta técnica generalmente se aplica cuando encontramos:
Hipospadias, endometriosis leve, disfunción ovulatoria, falla en la licuefacción del semen, baja calidad y cantidad de espermatozoides (oligoastenozoospermia), incapacidad para depositar semen en la vagina (eyaculación retrograda), alteración del moco cervical y/o presencia de anticuerpos contra los espermatozoides.

1.2.3.2 FECUNDACIÓN IN VITRO (FIV)

Desde que se produjo el primer nacimiento mediante FIV, en Inglaterra, en 1978, cientos de miles de niños y niñas han nacido gracias a esta técnica, siendo ampliamente demostrada la seguridad de su uso.

DEFINICIÓN

La palabra "*in vitro*" es un término en latín que significa "*en cristal*". Este vocablo se lo adquirió debido a que los primeros experimentos biológicos en los que se realizaron cultivos de tejidos fuera de los organismos vivos de los cuales procedían, se llevaban a cabo en contenedores de cristal, tales como tubos de ensayo, probetas o placas petri. En la actualidad, el vocablo *in vitro* se refiere a cualquier procedimiento biológico que se efectúa fuera del organismo en el que tendría lugar normalmente.

La fecundación *in vitro* (FIV) es un técnica que facilita la fertilización del ovocito por los espermatozoides en condiciones de cultivo *in vitro*, previa obtención y preparación de gametos.¹⁶

¹⁴ REMOHÍ J, COBO A, ROMERO J, M.J de los SANTOS, PELLICER A (2007), " Manual práctico de esterilidad y reproducción Humana". Editorial Mc Graw Hill-Interamericana, 3ª Edición, Cap 1, 2, 3.

¹⁵ VANRELL Joan Antoni, CALAF Joaquín, BALASCH Joan, VISCASILLAS Peren(1992), "Fertilidad y Esterilidad Humanas". Ediciones Científicas y Técnicas, Barcelona- España; cap 28



OBJETIVO

Preparar el esperma *in vitro*, para que los ovocitos estén expuestos a concentraciones óptimas de espermatozoides móviles de alta calidad.

CICLO DEL FECUNDACIÓN IN VITRO

El ciclo de FIV comprende las siguientes fases.

a. Estimulación Ovárica

Se inicia el tercer día de la menstruación y consiste en la aplicación de un régimen de medicación para estimular el desarrollo de múltiples folículos en los ovarios y aumentar el número de ovocitos que maduran en un mismo ciclo. En la mayoría de las pacientes se emplean inyecciones de gonadotropinas (generalmente análogos de la FSH), bajo controles frecuentes de los niveles de estradiol, y del crecimiento folicular.

b. Aspiración folicular y extracción de ovocitos

Los ovocitos se localizan dentro de unos "globos" (de aproximadamente 2 cm. de diámetro) llenos de líquido, llamados folículos, que se encuentran al interior de los ovarios.

Cuando se considera que la maduración de los folículos es adecuada, se administra a la paciente 10.000U de gonadotropina coriónica humana (β -hCG). Esta molécula, que actúa como un análogo de la hormona luteinizante (LH), provocará la maduración completa y la ovulación alrededor de 36 horas después de la inyección.

La aspiración folicular se programa entre las 34 y 36 horas de administrada la hormona, ya que es el momento previo a la ovulación y cuando la mayoría de óvulos están maduros y todavía no son capturados por el oviducto. La recuperación de los ovocitos se logra al aspirar el líquido de los folículos vía transvaginal, utilizando una aguja que pincha la pared vaginal para alcanzar los ovarios; puede realizarse mediante anestesia general o parcial y al interior de

¹⁶ VANRELL Joan Antoni, CALAF Joaquín, BALASCH Joan, VISCASILLAS Peren (1992), "Fertilidad y Esterilidad Humanas". Ediciones Científicas y Técnicas, Barcelona- España; cap 29



un quirófano que garantice la esterilidad del procedimiento, evitando contaminación ó la pérdida de la calidad los ovocitos recuperados. Los ovocitos junto con el fluido folicular se trasladan al laboratorio de FIV para identificarlos. El número de ovocitos maduros recuperados habitualmente oscila entre 8 y 12, aproximadamente, aunque hay pacientes que tienen mejor respuesta ovárica y por tanto mayor número de ovocitos y otras en las que sucede lo contrario.

c. Fase lútea

La progesterona, producida por el cuerpo lúteo, es necesaria para preparar un endometrio receptivo que facilite la adhesión y penetración del embrión al mismo. Además mantendrá el ambiente uterino adecuado para el desarrollo y crecimiento del feto hasta el momento del nacimiento. Debido a que en el proceso de la aspiración folicular, se extrae junto con el ovocito gran cantidad de células que tapizan el interior del folículo (células de la granulosa) y que son las encargadas de la producción de progesterona, es muy importante un aporte exógeno de progesterona para que no se vea comprometida la fase lútea.

La función de la β -hCG en un ciclo natural es estimular a las células del folículo ovárico (cuerpo lúteo) para que continúen secretando progesterona y permitiendo el mantenimiento del embarazo hasta que la placenta se desarrolle lo suficiente y asuma esta función (hacia la semana 7-8 de gestación).

d. Preparación semen para FIV

La muestra de semen se trata por diferentes técnicas de capacitancia para seleccionar los espermatozoides de mejor movilidad y luego se concentran en un número adecuado. Si el semen proviene de un donante, primero habrá sido congelado, puesto en cuarentena, y luego descongelado para capacitarlo.

e. Fecundación In Vitro

➤ Inseminación a óvulos

Con este término se designa al hecho de poner en contacto los espermatozoides con los ovocitos. Los ovocitos se lavan, eliminando las células que los rodean y se depositan individualmente en unas gotas minúsculas de medio de cultivo, cubiertas con un aceite especial para evitar que se evaporen. Los espermatozoides capacitados, se introducen, con la



ayuda de una pipeta especial, en estas microgotas que contienen a los ovocitos (75.000:1), dicho proceso se lleva a cabo entre las 3 y las 6 horas posteriores a la obtención de los ovocitos. Las microgotas constituyen un medio de cultivo con sustancias y nutrientes basados en el fluido tubárico humano. Las plaquitas donde se encuentran las microgotas, ahora ya con óvulos y espermatozoides juntos, se introducen en una incubadora que los mantiene en un ambiente adecuado de temperatura, proporción-pureza de gases y humedad; a la espera de confirmarse la fecundación a partir de las 15 ó las 20 horas siguientes.

➤ Fecundación

Para que el proceso de fecundación se lleve a cabo deben suceder una serie de eventos: así varios espermatozoides deberán interaccionar con la capa que rodea al ovocito (zona pelúcida) y fusionarse a ella. Esto produce un cambio en la cabeza del espermatozoide llamado reacción acrosómica que entre otras cosas produce la liberación de sustancias como la acrosina que posibilita que uno de ellos penetre hasta el interior del ovocito; y mediante una serie de cambios moleculares, bloquea el paso a otros espermatozoides. Todo ello propicia la activación del ovocito que termina con la liberación del corpúsculo polar y la aparición del pronúcleo femenino. A su vez, se produce la descondensación del núcleo del espermatozoide y la formación del pronúcleo masculino. Finalmente ambos pronúcleos se fusionan dando lugar al cigoto.¹⁷

f. Cultivo de embriones

Una vez que se ha obtenido el cigoto, se traslada a medios de cultivo especiales para promover la división celular y crecimiento del embrión.

Tipos de medio de cultivo:

- a. Medios simples: Son óptimos para el cultivo inicial del embrión hasta 3 días, período tras el cual alcanzarían un estadio de 6-8 células.
- b. Medios complejos: Son los más adecuados para el cultivo del embrión desde el día 3 hasta el 5, período tras el cual alcanzarían el estadio de blastocisto, compuesto por 12-16 células.
- c. Medios secuenciales: se componen de tres tipos de medios: un medio para

¹⁷ CÁNOVAS BERNABÉ Sebastián (2007), "Interacciones homólogas y heterólogas *in vitro* de gametos porcinos, bovinos y humanos, y sus aplicaciones en el estudio de la fecundación", Murcia. Disponible en http://www.tdr.cesca.es/TESIS_UM/AVAILABLE/TDR-0906107-104739//Canovas07de14Discusion-conclusiones.PDF [23/07/10].



la preparación de los gametos, otro para el desarrollo hasta el día 3 y un tercero para alcanzar la fase de blastocisto.

g. Selección de embriones

Los laboratorios especializados en FIV han desarrollado métodos de puntuación para juzgar la calidad de los ovocitos y los embriones. Típicamente, los expertos examinan la simetría del embrión, el número de células, grado de fragmentación ó la integridad estructural de sus células y el crecimiento general entre dos y cinco días tras la fecundación.

h. Transferencia de embriones

La transferencia de embriones es la culminación de un proceso que empezó varias semanas antes con la estimulación ovárica de la mujer. Este paso se realiza en forma ambulatoria, no requiere analgesia ya que es indoloro. Primero se coloca a la mujer en posición ginecológica, se introduce un espéculo para ver el cuello uterino. Los embriones a transferir, sumergidos en un medio de cultivo se colocan en un catéter de transferencia (tubo estéril largo y delgado), suavemente se guía éste a través del cuello uterino y se coloca el contenido en la cavidad uterina para que los embriones se implanten y prosigan su desarrollo.

La transferencia debe ser lo más delicada posible, evitándo tocar el fondo del útero o forzar la entrada de la cánula a través del cérvix, de lo contrario se liberan prostaglandinas que favorece la producción de contracciones uterinas. El número de embriones que se transfieren depende del número disponible, la edad de la mujer, consideraciones diagnósticas y limitaciones legales.^{12, 18, 19}

¹⁸ URBINA, LERNER, BIBER (2008). "Fertilidad y Reproducción Asistida". Editorial Panamericana, Caracas-Venezuela, cap 34

¹⁹ PASQUALINI Sergio(2010). "Técnicas de fertilización". Disponible en <http://www.bebesenlaweb.com.ar/elembrazoyvos/preconcepcion/tecnicasfertiliza.html> [23/07/10]



APLICACIONES

Generalmente se aplica cuando hay obstrucción de los oviductos (patología tubárica bilateral), endometriosis, fallo de inseminación, oligoastenozoospermia, problemas del endometrio, disfunción ovulatoria ovárica, presencia de anticuerpos anti-espermatozoides en la mujer o en el hombre, mujeres menopáusicas con ovocitos procedentes de una donante.

1.2.3.3 INYECCIÓN INTRACITOPLASMÁTICA CON ESPERMATOZOIDE



Figura N° 1. Fotografía de un procedimiento de ICSI.

DEFINICIÓN

La inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) es una de las técnicas más novedosas, que se ha desarrollado intensamente en los últimos años, y ha presentado mayor repercusión en el tratamiento de la infertilidad. Está asociada a la FIV y permite inyectar directamente un espermatozoide en el ovocito utilizando técnicas de micromanipulación. El primer embarazo conseguido mediante esta técnica data de 1992 y su incorporación al laboratorio como método de rutina está abalada tanto por los resultados obtenidos como por las nuevas perspectivas de tratamiento que ofrece a parejas con infertilidad debida a problemas masculinos severos y que veían anteriormente limitadas sus posibilidades de procreación mediante la fecundación in vitro (FIV) convencional.¹⁸

ASPECTOS GENERALES

La característica más sobresaliente del ICSI es que sus resultados no están influenciados ni por la concentración, ni por la movilidad, ni por la morfología espermática. Esto es debido a que se realiza una selección de los mejores espermatozoides presentes en las muestras de semen. En la concepción natural, sólo los espermatozoides más fuertes son capaces de fecundar el



óvulo, con lo que se descartan los espermatozoides de menor calidad. Durante el tratamiento con ICSI, los espermatozoides se eligen y se inyectan en el óvulo, lo que admite la posibilidad de que se utilicen espermatozoides más débiles. Si una infertilidad grave en el hombre es uno de los factores, la preocupación es que se transmitan las causas de la infertilidad a los hijos, junto con otras anormalidades cromosómicas y problemas genéticos.

OBJETIVO

El objetivo, a lo largo de todo el proceso, es supervisar, evaluar y seleccionar aquellos embriones que por sus características morfológicas ofrezcan una mayor garantía de implantación en el útero materno.

CICLO DE ICSI

Un ciclo de ICSI incluye una serie de fases:

a. La estimulación ovárica, aspiración folicular, fase lútea; se realizan de la misma manera que para FIV convencional.

b. Preparación de los ovocitos

Una vez obtenidos los ovocitos por aspiración folicular se despoja el cúmulus, las células de la corona radiada, para comprobar su estado madurativo. Para separar las células del cúmulus y de la corona, se aprovecha de procedimientos tanto mecánicos como enzimáticos. Para ello se realizan una serie de lavados en una solución tamponada de hialuronidasa de 80 UI (enzima encargada de romper uniones intercelulares). Es necesario controlar tanto la concentración como el tiempo de exposición a la enzima, para evitar cualquier lesión de la estructura ovocitaria. Solamente serán microinyectados los que estén en Metafase II, con morfología normal, zona pelúcida intacta, ausencia de vesícula germinal y con expulsión de un corpúsculo polar.

c. Capacitación espermática.- se lleva a cabo de la misma manera que para la inseminación y/o FIV.

d. Preparación de las pipetas.

El ICSI se realiza sobre un microscopio electrónico invertido, al cual se le han adaptado micromanipuladores que permiten mover unos capilares muy finos



(pipetas) con los que podemos aspirar o soltar pequeñísimas cantidades de líquido y con él, espermatozoides. Los micromanipuladores consisten en un sistema con unos "joy-sticks" hidráulicos que controlan microscópicamente el movimiento de los capilares. Los microcapilares tienen adaptados unos microinyectores, que básicamente son jeringuillas cuyo movimiento puede manejarse con extraordinaria precisión.

Microcapilares empleados para ICSI:

- pipeta de sujeción (holding) que sujeta al ovocito.
- pipeta de microinyección que introduce el espermatozoide.

e. Microinyección

Para que durante el proceso de microinyección no se den cambios bruscos de temperatura, ni de pH en el medio donde están los ovocitos; la platina del microscopio debe estar a 37°C y al medio de cultivo se le añaden sustancias tampón que evitan alteraciones. El proceso en sí, no es más que microinyectar un espermatozoide dentro de un óvulo. Para ello, en la placa sobre la que se va a realizar la microinyección se colocan unas microgotas de medio específico donde se ubican los ovocitos desnudos y otras de un medio más denso para los espermatozoides. Los espermatozoides previamente capacitados, son situados en el centro de una gota de un medio de cultivo más denso de lo normal que enlentece el movimiento de los mismos, facilitando así su manipulación. Los mejores de ellos, avanzarán hasta el borde de la gota. Allí, con la ayuda del microcapilar de inyección, son cuidadosamente elegidos, uno para cada ovocito maduro que tengamos que microinyectar, e inmovilizados. La inmovilización evita que el espermatozoide pueda salir del óvulo una vez microinyectado y además produce una alteración en su membrana similar a la que tiene lugar en la reacción acrosómica y que por tanto, le permite fecundar. A continuación el espermatozoide es aspirado y microinyectado dentro del ovocito formando un pequeño orificio en la zona pelúcida. Las membranas del ovocito son muy elásticas, por lo que una vez puncionado, aspiramos para asegurarnos que la membrana se ha roto y el espermatozoide ha quedado situado en el interior del ooplasma. Una vez microinyectados todos los óvulos, son cuidadosamente lavados, pasándolos por medios de cultivo basados en el



fluido tubárico, para que desaparezca la sustancia tampón (HEPES) del medio de ICSI.

f. Valoración de la fecundación

Luego de un tiempo de incubación (15-20 horas), el biólogo realiza la visualización de pronúcleos que confirma, en cada ovocito microinyectado, si se ha producido la fecundación ó no.

g. Finalmente el cultivo y transferencia de embriones se realiza de igual manera que para la fecundación in vitro ^{12,16, 5, 20}

APLICACIONES

Fallo FIV convencional, alta tasa de anticuerpos anti-espermatozoides, ausencia de receptores en la zona pelúcida ó en los mismos espermatozoides que permitan la adhesión de éstos al ovocito, oligoastenozoospermia, teratozoospermia, biopsia testicular, edad materna avanzada, infertilidad inexplicable, aspiración microquirúrgica de espermatozoides del epidídimo (MESA), aspiración percutánea de espermatozoides del epidídimo (PESA), Extracción de espermatozoides del testículo (TESE).

²⁰Producción in vitro de embriones (Abril 2002). Disponible en: <http://canal-h.net/webs/sgonzalez002/Manipulacion/PRODUCCION.htm> [23/07/10]



1.3 BASES FISIOLÓGICAS DE LA CAPACITACIÓN

1.3.1 TRACTO REPRODUCTIVO FEMENINO

El sistema reproductor femenino es susceptible a infecciones por patógenos, especialmente durante el coito, sin embargo, por este motivo, está equipado con distintas defensas antimicrobianas que se resumen en una respuesta inmune, y un ambiente de pH ácido. Estas defensas también afectan a los gametos masculinos, al considerarlos agentes extraños, por ello, adoptan distintas estrategias para conseguir paso a través de la vagina.

Está constituido por órganos internos y externos encargados de garantizar la reproducción humana.

Los órganos internos constituyen la vagina, cérvix, útero, oviducto y ovarios; cuyas secreciones son responsables de la capacitación espermática, el mantenimiento de la viabilidad, motilidad del espermatozoide, la regulación de su actividad enzimática e interacción de los gametos.²¹

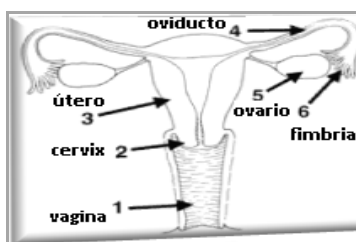


Figura N° 2. Órganos internos del aparato reproductor femenino.

➤ VAGINA

La vagina es el órgano de la cópula y no desempeña ningún papel activo en el transporte del espermatozoide, por el contrario afecta adversamente la viabilidad espermática, consecuencia de un pH bajo (3-4) producido por la microflora vaginal, especialmente los bacilos de Doderlein (lactobacilos anaerobios), que crean una elevada acidez gracias a la producción de ácido láctico a partir de glucógeno vaginal, protegiéndola de ser colonizada por gérmenes patógenos, y

²¹ CARRAZCO VILLAMIZAR (2007) Luis. "Actividad de siete exoglicosidasas, concentración de proteínas y cambios de volumen en el fluido oviductual de las especies bovina y porcina a lo largo del ciclo estral. Murcia. Disponible en: http://www.tdr.cesca.es/TESIS_UM/AVAILABLE/TDR-0125108-094357/CarrascoVillamizar01de18.pdf [23/07/10]



a su vez conduce a la inmovilidad total de los espermatozoides 6 horas posteriores al coito.

Existe un número importante de espermatozoides, que se queda rezagado en la entrada de la vagina junto con el plasma seminal, formando un coagulado tipo gel, que promueve el transporte de los demás hacia el útero, protegiéndolos del ambiente hostil de la vagina. Este gel, es degradado enzimáticamente en el transcurso de media a una hora, por el antígeno prostático específico (PSA).²²

➤ CÉRVIX

La secreción del cérvix está compuesta por mucopolisacáridos y glicoproteínas, cuya variación en la composición química y física responde a estímulos hormonales. Bajo el estímulo de los estrógenos se produce abundante moco cervical de apariencia clara ó transparente, consistencia líquida y con un pH ligeramente alcalino. Estas propiedades facilitan la viabilidad y el transporte de los espermatozoides. Por el contrario bajo el efecto de la progesterona se produce moco en menor cantidad cuya consistencia es viscosa, estos cambio físicos le permiten comportarse como barrera fisiológica para el acceso de los espermatozoides al útero.²³

➤ ÚTERO

El útero es un órgano hueco y musculoso destinado a albergar al embrión durante su desarrollo, está constituido por tres capas que son el miometrio, perimetrio y endometrio; donde este último presenta cambios en la mucosa a lo largo del ciclo por efecto de las hormonas. El pH promedio del mucus uterino es de 7,6. Representa el sitio de inicio de la capacitación, aunque se ha acreditado al oviducto como principal sitio para este proceso, específicamente en la región del istmo.

²² PALMA Gustavo (1986). "Biotecnología de la reproducción". Disponible en http://www.reprobiotec.com/transporte_espermatico.html [5/08/10].

²³ ODEBLAD (2010). "Verificación científica del método de la ovulación por el doctor Erik Odeblad". Disponible en <http://www.familiadelasamericas.org/index/scientific-verification-of-the-ovulation-method-by-dr-erik-odeblad>. [23/07/10]



➤ OVIDUCTO

La trompa uterina u oviducto es un órgano complejo formado por un par de túbulos que comunican los ovarios con el útero, su función es finamente regulado por hormonas esteroideas.

Anatómicamente el oviducto presenta 4 regiones conocidas como: fimbria, infundíbulo, ámpula e istmo.

La fimbria tiene forma de embudo y consta de prolongaciones digitiformes adyacentes al ovario que permiten la captación del óvulo. El infundíbulo es la continuación tubular de la fimbria y constituye el tercio distal del órgano tiene como finalidad el transporte de los gametos e histológicamente no puede distinguirse del ámpula. El ámpula es la porción media del oviducto, se extiende desde la unión istmo ampular hasta el infundíbulo, en ella ocurre preferentemente la fecundación, en particular en la unión istmo ampular, además presenta mayor grado de secreción debido a contiene mayor número de pliegues y superficie epitelial lo que favorece los procesos de extravasación de sustancias a partir del plasma sanguíneo. El istmo forma el tercio proximal del oviducto, adyacente al útero; presenta concentraciones altas de colesterol, y baja de fosfolípidos; lo contrario sucede a nivel del ámpula.

La mayor relación colesterol/fosfolípidos en el fluido del istmo estabiliza la membrana plasmática del espermatozoide e inhibe la reacción acrosómica. La menor relación colesterol/fosfolípidos hallada en el fluido ampular desestabiliza la membrana del espermatozoide promoviendo la capacitación y reacción acrosómica.²⁴

El oviducto se caracteriza por variaciones en la composición, secreción, y dirección del fluido oviductual durante las distintas etapas del ciclo ovárico y a lo largo de las diferentes regiones anatómicas. Contiene un líquido formado en parte por la secreción del endotelio tubárico (mucinas, prostaglandinas, proteínas dependientes de estrógenos) y en parte por trasudación de moléculas extravasadas del plasma sanguíneo (albúmina, transferrina e inmunoglobulinas), es rico en iones, enzimas, compuestos energéticos,

²⁴ ARANDA Vet, BRAVE Vet, CASAGRANDE Vet. INTA (2002). "COLESTEROL EN BOVINOS". Disponible en http://www.produccion-animal.com.ar/informacion_tecnica/carne_y_subproductos/26-colesterol_en_bovinos.pdf [12/06/10]



proteínas, aminoácidos, proteasas (acrosina), además de secreciones de las células del cúmulus que rodean a los ovocitos (progesterona).^{25,26}

➤ OVARIOS

Son dos órganos productores de gametos femeninos u ovocitos, situados a los lados del útero, de forma semejante a una almendra; su tamaño varía según la cavidad, etapa del ciclo y la edad.²⁷

Funciones de los segmentos anatómicos de la mujer en contacto con el espermatozoide.

Segmento anatómico	Función
Vagina	Mezcla de secreciones del tracto reproductivo masculino y femenino, transporte pasivo, pasaje en dirección al cérvix y retrogrado
Cérvix	Migración, Retención, Reservorio y Eliminación del exceso
Útero	Separación del líquido seminal y Transporte activo – Capacitación
Unión útero-tubárica	Selección y almacenamiento – Capacitación
Istmo	Selección y disminución de la motilidad – Capacitación
Ámpula	Hipermotilidad –Fecundación.

Tabla N° 4. Funciones de los segmentos anatómicos de la mujer.

1.3.2 EL SEMEN

El semen o eyaculado es un fluido compuesto por: espermatozoides (producido en los testículos) y plasma seminal (secreción combinada de glándulas anexas al aparato genital masculino: bulbo uretral, uretrales, epidídimo, próstata y

²⁵ CARRAZCO VILLAMIZAR Luis (2007). "Actividad de siete exoglicosidasas, concentración de proteínas y cambios de volumen en el fluido oviductual de las especies bovina y porcina a lo largo del ciclo estral". Murcia. Disponible en: http://www.tdr.cesca.es/TEsis_UM/AVAILABLE/TDR-0125108-094357//CarrascoVillamizar02de18.pdf [23/07/10]

²⁶ ANZALDÚA Santiago, PÉREZ Mario, CERBÓN Marco, CAMACHO Ignacio(2003). "Actividad secretora del oviducto de mamíferos domésticos durante la fertilización y el desarrollo embrionario temprano" Disponible en <http://www.fmvz.unam.mx/fmvz/cienciavet/revistas/CVvol9/CVv9c8.pdf> [15/06/10]

²⁷ GUTIERREZ G (2009). "Aparato reproductor femenino", Equipo Biología.. Disponible en <http://equipobiologia.blogspot.com/> [25/06/10]



vesículas seminales), cuyo pH varía entre 6,7 y 7,4. Durante la eyaculación, los espermatozoides entran en contacto con el plasma seminal, proceso en que los espermatozoides adquieren factores descapacitantes ó estabilizantes del acrosoma; que se presentan en forma de glicoproteínas de superficie.

1.3.2.1 PLASMA SEMINAL

El plasma seminal se considera esencial como transportador y protector de los espermatozoides, contribuye con factores nutricionales, no obstante durante su transporte a lo largo del tracto femenino este va separándose, siendo muy improbable hallar plasma seminal en el oviducto.

Se ha encontrado, que el plasma seminal inhibe la activación del complemento, suprime la quimiotaxis y migración de los leucocitos polimorfonucleares (PMN) uterinos para evitar la fagocitosis de los espermatozoides. Sin embargo, los espermatozoides dañados por las contracciones, muertos, ó que tienen una movilidad reducida, son automáticamente eliminados por este mecanismo. El plasma seminal en contacto con la secreción vaginal, produce una neutralización de pH, evitando la eliminación de los gametos masculinos. A pesar de estas ventajas, solo un número minoritario de los mismos, escapa a este ataque.

COMPONENTES DEL PLASMA SEMINAL

Proteínas(albumina- globulina)-----	1.58 a 1.80 mg/100 ml
Aminoácidos.....	31-56 mEq/litro
Cloruros.....	230-280 mEq/100 ml
Glucosa.....	380-610 mg/100 ml
Fructuosa.....	120-450mg/dl
Fósforo inorgánico.....	40-50 mg/100 ml
Fósforo total...(ácido soluble).....	95 mg/100 ml
Fósforo - espermina -	13 - 30 mg/100 ml
Colesterol.....	80 mg/100 ml
Ácido láctico.....	36 - 51 mg/100 ml
CO ₂	41 a 60 vol. por 100 ml
Fosfatasa ácida.....	540 a 4000 U.K.A.
Fosfatasa alcalina.....	0.1 1 U. King-Armstrong
Hialuronidasa.....	100 U. por 100 ml
Además contiene: fosforilcolina, ergotina, ác. Ascórbico, espermina, ácido cítrico, fibrinolisisina, zinc, prostaglandinas.	
El sistema Tampón o Buffer es constituido por fosfato/bicarbonato.	



Espermatozoides.....20' 000. 000
/ ml

Tabla N° 5. Componentes del plasma seminal

De hecho ciertos componentes del plasma seminal contribuyen a la fertilidad y otros actúan como factores de infertilidad ó descapacitación; estos últimos están compuestos principalmente por proteínas que inhiben la movilidad, capacitación y reacción acrosómica.²⁸

1.3.2.2 EL ESPERMATOZOIDE

El espermatozoide (proviene del griego *esperma*: semilla y *zoon*: animal) es una célula con una dotación cromosómica haploide, altamente diferenciada y compartimentada que constituye el gameto masculino.

Sus dos estructuras principales (cabeza y flagelo) no tienen conexión alguna, y por lo tanto los procesos que tienen lugar en un compartimiento no afectan a aquellos que se producen en el otro.²⁴

1.3.2.2.1 MADURACIÓN DE ESPERMÁTIDES

Existen cuatro fases características en la transformación de espermátides a espermatozoides: fase de Golgi, capuchón, acrosomal y de maduración.

- ❖ **Fase de Golgi:** La organela del mismo nombre se acerca al núcleo, desprende vesículas que se le sobreponen y poco a poco se unen para convertirse en el saco acrosomal que se localiza en la parte apical del núcleo. Los centríolos localizados en la cercanía del aparato de Golgi, migran hacia lo que será la base del núcleo. El centríolo proximal se sitúa en la parte basal del núcleo y, a partir del centríolo distal crece el axonema.
- ❖ **Fase de capuchón:** el saco acrosomal se aplana formando una verdadera capucha sobre el núcleo. El núcleo se compacta mucho más al cambiar las histonas por protaminas, de tal forma que no puede haber ni replicación ni transcripción.

²⁸ PALOMO María (1995). "Efecto del tratamiento de los espermatozoides sobre la fecundación in vitro en el caprino". Disponible en http://www.tesisenxarxa.net/TESIS_UAB/AVAILABLE/TDX-0629109-154131/TMJPP1de2.pdf [15/06/10]



- ❖ **Fase acrosomal:** el acrosoma se orienta en dirección de la membrana basal; el citoplasma se desplaza hacia la base de la cabeza y se localiza por debajo de la unión núcleo axonema; las mitocondrias se agrupan alrededor de este último en su parte cercana al núcleo, formando la pieza media. En esta fase el espermatozoide adquiere su morfología definitiva.
- ❖ **Fase de maduración:** se observan las características finales de los espermatozoides. En esta fase se elimina gran parte del citoplasma por desplazamiento del mismo hacia la pieza terminal de la cola originando la llamada gota citoplasmática.

El proceso de maduración termina con la espermiación, ó liberación de los espermatozoides a la luz del túbulo seminífero y mediante movimientos peristálticos los espermatozoides son transportados de la *rete testis* a los ductos eferentes y de allí al epidídimo en cuya cola se almacenan.

Durante la eyaculación los espermatozoides junto con el plasma seminal pasan por la uretra y se liberan en el tracto genital femenino.²⁹

1.3.2.2.2 ESTRUCTURA DEL ESPERMATOZOIDE

Región	Forma	Longitud	Diámetro
CABEZA	Lisa sin irregularidades y oval	4-5 μm	2.5-3.5 μm
PIEZA MEDIA	Unida axialmente a la cabeza	7-10 μm	Menos de 1 μm de ancho
COLA	Única y recta	45 μm	

Tabla Nº 6. Partes del espermatozoide

➤ Cabeza

La cabeza posee el núcleo haploide de cromatina altamente condensada y el acrosoma que se encuentra en la región apical entre el núcleo y la membrana plasmática. La región acrosomal del espermatozoide ocupa del 40-70% del área de la cabeza.

²⁹ LANGMAN Sadler (2006), "Embriología Médica con Orientación Clínica", Editorial panamericana, 10ª edición, Madrid- España, Cap 2.

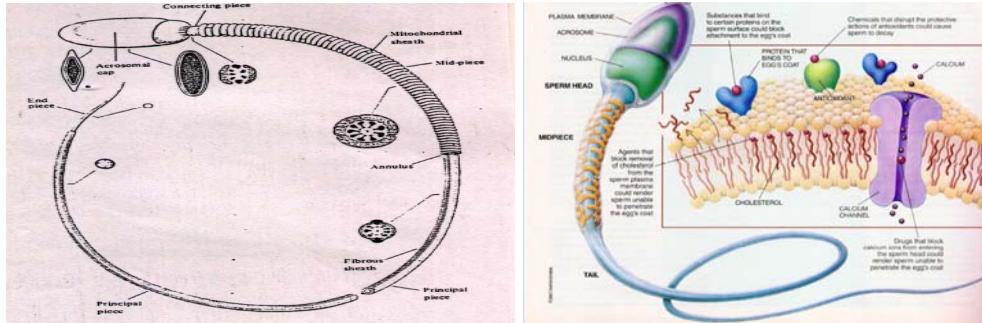


Figura N° 3 y 4. Estructura del espermatozoide.

➤ Flagelo

El flagelo del espermatozoide le permite nadar y cumplir con su principal cometido, fecundar al ovocito e introducir en él su material genético; está constituido principalmente por el *axonema* que es un complejo aparato formado por microtúbulos, moléculas chaperonas, proteínas fijadoras de calcio y proteínas quinasas/ fosfatasas, y, es el responsable del movimiento flagelar.

El axonema consta de 2 pares de microtúbulos centrales rodeados por nueve pares más, que se disponen a lo largo del flagelo y se conectan entre sí a través de los brazos de dineína; los microtúbulos centrales se conectan con los externos por medio de radios.

Los radios están integrados por 22 polipéptidos con una proteína de 97 kDa con un dominio AKAP en su base.

El flagelo se diferencia en tres regiones: la pieza media, principal y terminal.

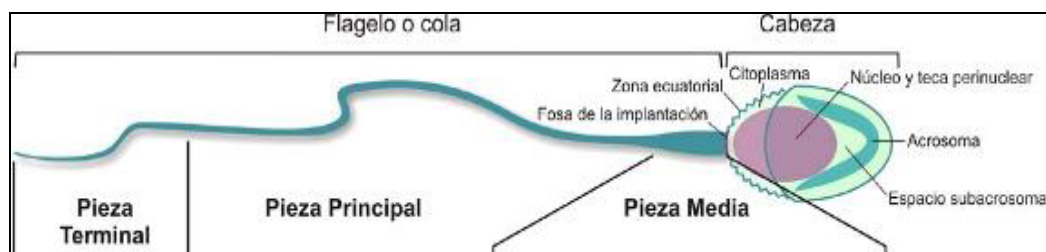


Figura N° 5. Regiones del flagelo de un espermatozoide.

En la pieza media, los microtúbulos están rodeados por mitocondrias en forma de hélice y capas de fibra densa, en la pieza principal por una capa fibrosa y en la pieza terminal está en contacto directo con la membrana plasmática. Esta última porción es más estrecha que la pieza media y no debe estar enrollada.

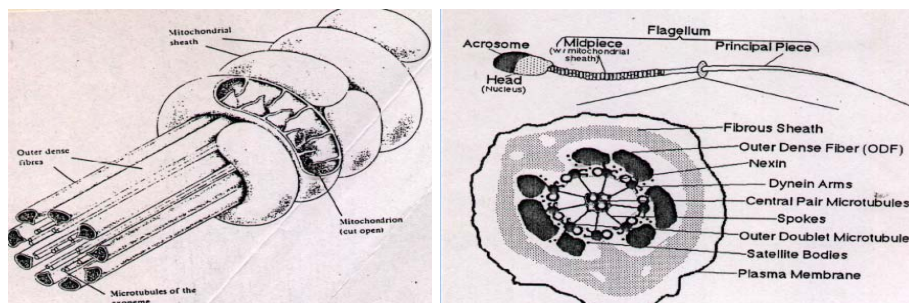


Figura Nº 6 y 7. Estructura de la pieza media y principal respectivamente.

La capa fibrosa está constituida por al menos 18 polipéptidos, sirve como andamio de algunas enzimas en el metabolismo energético, y como molécula de señal para desencadenar la movilidad espermática. Entre las proteínas que podemos encontrar están las hexoquinas y las AKAP 3, 4, 80; relacionadas con la fosforilación de tirosina de otros componentes de la capa fibrosa.³⁰

1.3.2.2.3 CARACTERÍSTICAS DEL ESPERMATOZOIDE

Los llamados factores de descapacitación provienen generalmente del epidídimo ó plasma seminal; se localizan entre la superficie y la membrana plasmática del espermatozoide.

La membrana plasmática del espermatozoide es una estructura dinámica y fluida donde la mayoría de sus componentes (lípidos, proteínas y glúcidos) son capaces de moverse y reorganizarse, constituyendo la eliminación de estos materiales de revestimiento parte de la capacitación.

➤ **Proteínas**

Las proteínas periféricas (glicoproteínas-fibronectina) están asociadas no covalentemente a lípidos de la bicapa que forman la matriz de la membrana, mientras que las proteínas intrínsecas están firmemente incrustadas en la bicapa y solo pueden ser eliminadas con tratamientos duros (detergentes). Por el contrario las proteínas periféricas pueden ser liberadas por la adición de agentes quelantes, por incremento de pH o fuerza iónica.

³⁰ VANRELL Joan Antoni, CALAF Joaquín, BALASCH Joan, VISCASILLAS Peren (1992), "Fertilidad y Esterilidad Humanas". Ediciones Científicas y Técnicas, Barcelona- España; cap 4,5.



La eliminación de moléculas periféricas permite que las proteínas estructurales en la bicapa se organicen libremente, prefiriendo la distribución tanto a nivel de la cola como de la cabeza.

➤ Lípidos

Los lípidos cumplen funciones estructurales y de barrera, son relativamente impermeables a la mayoría de moléculas solubles en agua, se caracterizan por la fluidez y permeabilidad de la membrana; y participan en la transducción de señales.

1.3.2.2.4 SUPERVIVENCIA DEL ESPERMATOZOIDE

Los espermatozoides al estar privados de mecanismos de transcripción y traducción deben sobrevivir en el tracto femenino, sin ningún tipo de mecanismo reparativo, como los que cuentan otros tipos de células.

Están expuestos continuamente a un estrés físico durante la eyaculación y a las contracciones uterinas, por lo que son susceptibles de sufrir gran cantidad de daños oxidativos. Además de esto, y como ya se mencionó anteriormente, han de lidiar con las defensas inmunitarias de la mujer.

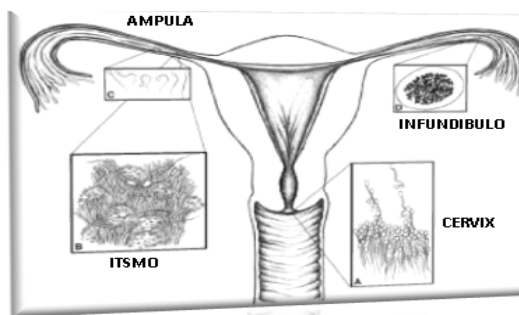


Figura N° 8. Esquema de supervivencia de los espermatozoides.

Los espermatozoides pueden mantenerse viables en el tracto reproductor femenino durante varios días, y solo el 1% de los espermatozoides depositados en la vagina entran en el cuello uterino donde sobreviven por varias horas; posteriormente para alcanzar las trompas de Falopio se requiere alrededor de 7



horas y cuando lo logran disminuyen la movilidad finalizando en este punto la migración.³¹

1.3.2.2.5 FACTORES QUE AFECTAN LA CAPACITACIÓN ESPERMÁTICA

FACTORES CAPACITANTES	FACTORES DESCAPACITANTES
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Glicosaminoglicanos (Heparina, ácido hialurónico, condroitin sulfato). ▪ Aceptores del colesterol: albúmina, lipoproteínas que desestabilizan la membrana del espermatozoide. ▪ Catecolaminas, taurina e hipotaurina: Promueve la hiperactivación del espermatozoide. ▪ Enzimas: beta-amilasa (presente en los eosinófilos), beta-glucuronidasa esterol sulfatasa. Promueven la hiperactivación del espermatozoide. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Sulfatos de esteroides ▪ Zinc ▪ Materiales de revestimiento del espermatozoide: Proteínas periféricas de la membrana externa, Relación elevada colesterol/fosfolípidos. ▪ Canales de calcio bloqueados ▪ Caltrin ▪ Prostaglandinas ▪ Factor quiescente

Tabla Nº 7. Factores capacitantes y descapacitantes del espermatozoide.

1.4 CAPACITACIÓN ESPERMÁTICA

1.4.1 GENERALIDADES

Cuando el semen es depositado en la vagina durante el coito, los espermatozoides son incapaces de fecundar el ovocito inmediatamente; precisando un periodo de incubación en las secreciones del tracto reproductor femenino para adquirir esta capacidad, como es el caso del útero que provee un medio con alta concentración de progesterona, 5% de CO₂, temperatura constante de 37°C, que en conjunto con otras moléculas producen cambios a nivel de los receptores de la membrana del espermatozoide.

³¹URDAPILLETA Leticia (2008). "Selección espermática- la lucha por la sobrevivencia". Disponible en <http://munlait.wordpress.com/2008/09/21/seleccion-espermatologica-la-lucha-por-la-supervivencia-i/> [6/06/10]



In vivo los espermatozoides están expuestos secuencialmente a distintos fluidos secretados por los diferentes segmentos del tracto genital, que culmina en el oviducto. "*In vitro*", la capacitación puede ser simulada incubando espermatozoides epididimarios o eyaculados en un medio definido; por lo que es probable que los espermatozoides "*in vivo*" sean capacitados bajo condiciones mucho más complejas y mejor controladas que "*in vitro*".

Es importante destacar que los cambios que se producen durante esta etapa pueden estar relacionados principalmente con la pérdida del estado de reposo o de represión que tienen los espermatozoides en el epidídimo.²⁴

1.4.2 DEFINICIÓN

La capacitación fue descrita por primera vez por Austin y Chang en 1951, "*in vivo*" se la define como un proceso de acondicionamiento del espermatozoide donde ocurren cambios estructurales y fisiológicos, consecuencia de la interacción entre la mucosa superficial del oviducto y el espermatozoide; puede durar entre 2 y 7 horas, consiguiendo eliminar tanto glicoproteínas como proteínas procedentes del plasma seminal que están unidos a la membrana plasmática, proporcionándoles la capacidad de sufrir la reacción acrosómica.³²

La capacitación "*in vitro*" se define como una serie de cambios bioquímicos y físicos que afectan las membranas y el metabolismo energético, requeridos por el espermatozoide para estar en condiciones de liberar el contenido acrosomal. Consiste en seleccionar aquellos espermatozoides con mejor movilidad mediante la eliminación del plasma seminal (que contiene prostaglandinas e inhibidores de la movilidad), espermatozoides inmóviles, junto con las células inmaduras y detritos; por distintos sistemas de lavado que posteriormente se incuban en medios de composición comparable a la del fluido oviductal.³³

³² MERINO Ricardo (2003). "Universidad austral de chile- facultad de ciencias veterinarias-instituto de reproducción animal- estudios preliminares en capacitación in-vitro de espermatozoides ovinos frescos y congelados" valdivia-chile. Disponible en www.fvm562e.pdf [23/07/10]

³³ MATÁS, GARCÍA, SANSEGUNDO, GADEA, COY, RUIZ (2007). "Estudio de la capacitación espermática *in vitro* en espermatozoides eyaculados y epididimarios". Dpto. Fisiología, Facultad de Veterinaria, Universidad de Murcia. Disponible en <http://www.um.es/grupo-fisiovet> [23/07/10]



1.4.3 BASES MOLECULARES DE LA CAPACITACIÓN

A pesar de que se han realizado numerosos estudios acerca de los cambios ocurridos en la capacitación, sus mecanismos moleculares y las señales de transducción están parcialmente definidos, sin embargo se sostiene la existencia de varios cambios como:

a) Cambios en la membrana plasmática

Previo al proceso de fecundación, los espermatozoides deben llevar a cabo un proceso de maduración en el tracto reproductor femenino, asociado a la reducción del contenido de colesterol, modificaciones en el contenido de lípidos y proteínas de la membrana, que resultan en un incremento de la fluidez y permeabilidad de la membrana plasmática. Los principales componentes de la membrana involucrados en la re estructuración de la misma son el colesterol y los esfingolípidos, que están asociados a proteínas específicas constituyendo una unidad denominada microdominios que conforman “parches” dentro de la bicapa lipídica. Así es que a través de estos microdominios anclados en la membrana; se produce la transducción de señales (TdS) hacia el interior de la célula promoviendo el incremento de segundos mensajeros que desencadenan la activación y/o respuesta celular.³⁴

La reducción del colesterol de la membrana plasmática se da por lipoproteínas de alta densidad (HDL), lecitinas-colesterol aciltransferasa, apolipoproteína A-1 y albúmina presentes en el tracto genital femenino; cuya modulación de la fluidez de la membrana espermática, con aparición de zonas pobres en proteínas; y una serie de cambios en la permeabilidad iónica de la misma, ocasionan un aumento del pH intracelular. Esta alcalinización intracitoplasmática provoca la apertura de los canales de Ca^{2+} y la consiguiente entrada masiva de este catión.

La cantidad de fosfolípidos no parece cambiar considerablemente durante la capacitación.

³⁴ BOARELLI y colb (2007). Vol 03, Nº 2. “Revista médica universitaria UN- Cuyo” “Detección de la capacitación espermática basada en la visualización de los componentes lipídicos de microdominios de membrana”. Disponible en http://www.vol03_02_art04.pdf [12/06/10]



La maduración de los espermatozoides en el epidídimo conlleva un incremento significativo de las cargas negativas de la superficie y por el contrario la capacitación implica la disminución de estas cargas, a causa de la eliminación de los residuos de ácido siálico y de sulfato por hidrolasas presentes en el tracto genital femenino; logrando con ello cambios en la redistribución de fuerzas atractivas y repulsivas entre los grupos polares de la membrana lipídica. (polarización)^{24, 35, 36, 37}

Los sulfatos de esteroides (colesteril y demosteril sulfato) hacen su aparición en el fluido epididimario, se consideran constituyentes normales del plasma seminal y forman parte de la membrana plasmática que cubre el acrosoma de los espermatozoides; son considerados factores de descapacitación y una de sus funciones es conservar la estabilidad de la membrana, a consecuencia de la relación colesterol/fosfolípidos elevada.

La esteroide sulfatasa es una enzima presente en el oviducto, endometrio y folículos de graff, que hidroliza los compuestos sulfatados de los esteroides, lo que desestabiliza la membrana y conduce a un aumento del influjo de calcio a través de la misma.³⁸

b) Cambios en los iones intracelulares de los espermatozoides

Los espermatozoides vivos mantienen eficazmente gradientes iónicos a través de la membrana plasmática.

Entre las moléculas de la membrana que permiten el flujo de iones están los *canales iónicos*. Todas las células poseen canales iónicos; el espermatozoide no es la excepción. Los canales iónicos son proteínas membranales que forman un poro a través del cual los iones atraviesan las membranas de manera regulada y con gran eficiencia ($\sim 10^7$ iones/seg). La regulación de estos

³⁵E.R.S.ROLDAN(2009). "Preparación de los espermatozoides para la fecundación en mamíferos".Madrid. Disponible en <http://www.ovinoscaprinos.com.ar/FERTILIDAD/Preparacion%20de%20los%20espermatozoides.pdf> [12/06/10]

³⁶Austin CR (1985). En: Biology of Fertilization (CB Metz, A Monroy, eds.). Academic Press, New York, vol. 2, pp. 121-155. Disponible en www.anatomohistologia.uns.edu.ar/plantilla.asp?zona [23/07/10]

³⁷VALDEBENITO , C FLETCHER, V VERA, J FERNÁNDEZ (2009), Physical-chemical factors that regulate spermatid motility in fish: basic and applied aspects. Disponible en http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:Tczyl4nOpHEJ:www.scielo.cl/scielo.php%3Fpid%3DS0301-732X2009000200002%26script%3Dsci_arttext+MOVILIDAD+DE+LOS+ESPERMATOZOIDEOS+HUMANOS+EN+MEDIOS+ACUOSOS&cd=3&hl=es&ct=clnk&gl=ec ó www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0301...script [12/06/10]

³⁸ALLENDE R. "La vida del espermatozoide después de la espermatogénesis". Disponible en http://www.ciavt.com.ar/insumos/articulos_tecnicos/vida_esperma.pdf. [23/07/10]



canales influye sobre la movilidad, respiración y la capacidad de fecundación del espermatozoide.

Normalmente la concentración de Ca^{2+} intracelular en los espermatozoides es baja, tanto en la región de la cabeza como de la cola, debido a la presencia de una bomba de Ca^{2+} mediada por una ATP_{asa} , un *antiporter* $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ y un sistema de intercambio $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ en la membrana plasmática, así como debido al secuestro de Ca^{2+} en la mitocondria.

La capacitación origina modulación en la actividad del sistema de extrusión de Ca^{2+} , liberando este ión de estructuras subcelulares que conduce a un incremento de Ca^{2+} intracelular, así encontramos que a nivel de la cola del espermatozoide el influjo de Ca^{2+} conduce a la hiperactivación, al regular la curvatura del axonema de los espermatozoides, cuyo efecto está mediado por su unión a la calmodulina presente en los flagelos. También se ha descrito que en el tracto genital de la mujer, los cambios conformacionales parecen permitir que una proteína de bajo peso molecular denominada caltrin inhiba el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ provocando una entrada Ca^{2+} a cambio de Na^+ .

El plasma seminal rico en HCO_3^- favorece el movimiento transmembranal del este ión por antiportes Na^+/H^+ , induciendo el aumento del pH intracelular (pHi); además hace más negativo el potencial de membrana (hiperpolarización) y regula el metabolismo de adenosina monofosfato cíclico (AMPc).

La concentración de K^+ dentro del espermatozoide es superior a la extracelular, mientras que a nivel del Na^+ ocurre lo contrario; los cambios en la composición iónica del espermatozoide causados por contacto con el tracto genital femenino, particularmente del K^+ , modulan y controlan la expresión de su poder funcional y permite que el proceso sea de manera secuencial. La capacitación requiere concentraciones relativamente bajas de Na^+ , contrariamente a la reacción acrosómica.

La concentración intracelular de iones de zinc disminuye en el acrosoma durante la capacitación consecuencia de la desestabilización de la membrana de los espermatozoides.^{34, 38}



c) Cambios en el núcleo y acrosoma.

El núcleo de los espermatozoides es una estructura muy estable, debido a que posee un elevado número de *cross-links* de proteínas mediante puentes S-S, que garantiza la compactación a lo largo de la capacitación.

Si bien la estructura del acrosoma no varía durante la capacitación, su textura se modifica así como la matriz acrosómica.

d) Cambios en el metabolismo

Los cambios ocurridos consecuencia de la eliminación de colesterol en la membrana plasmática de los espermatozoides permiten que la energía sea más accesible. A menudo se ha expuesto que los espermatozoides exhiben un metabolismo incrementado (actividad glicolítica y oxidativa) después de ser incubados en el trato genital femenino, asociado a los sustratos presentes en el medio.

➤ GLUCOSA

El metabolismo energético a partir de glucosa es requerido para la activación del axonema e incluye la producción y regeneración de ATP y de intermediarios como el NADPH, necesarios para las vías de señalización interna, que conducen a la fosforilación de las proteínas flagelares. El ingreso de glucosa al citosol se da a través de transportadores específicos ó por reservas endógenas en forma de glicógeno.³⁹

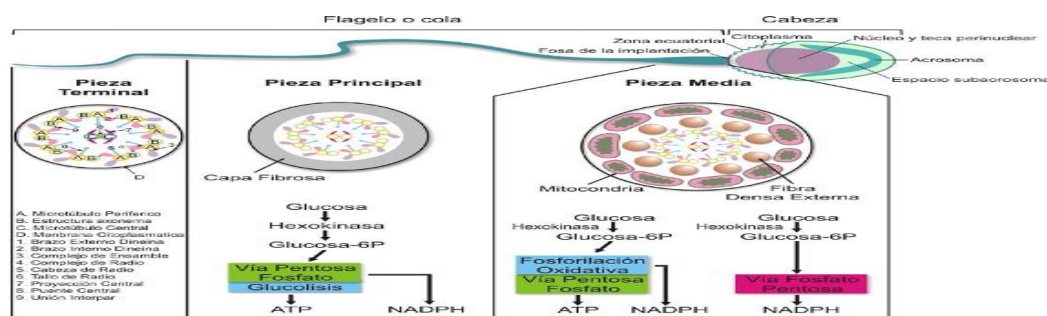


Figura N° 9. Morfología del espermatozoide y metabolismo energético que realiza esta célula a partir de glucosa en la pieza principal y en la pieza media.

³⁹ AIMALE y colb, Anátomo-Histología - Módulos: Aparato Reproductor. Disponible en <http://www.anatomohistologia.uns.edu.ar/plantilla.asp?zona=modrepro>. [12/06/10]



➤ OTROS SUSTRATOS

Cabe mencionar que la energía no es un factor limitante de la motilidad, ya que los espermatozoides pueden metabolizar una gran variedad de sustratos exógenos.

La concentración de carnitina aumenta en el fluido y en los espermatozoides desde el cuerpo hasta la región distal del epidídimo. En los espermatozoides la carnitina es rápidamente acetilada, y de esta forma actúa en el suministro de energía, sin embargo no está implicada directamente en la activación espermática.⁴⁰

Pero se han descrito factores para mantener inmóviles a los espermatozoides como es el caso del *factor quiescente* que se encuentra en el fluido epididimario y actúa conjuntamente con el pH, así encontramos que la alta tensión de CO₂ en el semen mantiene el pH del espermatozoide a ~7.2, impidiendo que naden los espermatozoides dentro del testículo; la energía para mover el flagelo proviene del ATP que hidroliza la dineína, una ATPasa que es inactiva a este pH. La concentración de CO₂ disminuye cuando se liberan los espermatozoides al oviducto; adicionalmente se alcaliniza el pH y se activa la dineína.

e) Cambios en el sistema adenilato-ciclase / proteína quinasa.

Los cambios en los sistemas adenilato ciclase/proteína quinasa A, están relacionados íntimamente con la fosforilación de proteínas y por consiguiente con la activación ó inactivación del flagelo.

En general, la fosforilación de la proteína es estimulada por la activación de las quinasas (Ca²⁺/calmodulina quinasas activadas, quinasas dependiente de AMPc (PKA), proteína quinasa activada calcio y fosfolípidos (PKC).

El AMPc puede activar directamente el sistema flagelar ó indirectamente a través del modelo clásico de acción del AMPc con fosforilación de las proteínas, específicamente sobre una proteína de 55 Kda denominada antígeno de fertilización-1 (FA-1 es receptor de la tirosina quinasa).

⁴⁰ TABARES y col (julio 2005), "Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias", Fisiología de la activación del espermatozoide en peces de agua dulce, vol18 N° 2, Medellín. Disponible en [www.scielo.unal.edu.co/scielo.php?script=sci...es.\[12/06/10\]](http://www.scielo.unal.edu.co/scielo.php?script=sci...es.[12/06/10]).



El aumento de AMPc se debe a la activación de la adenililciclase, y a la inhibición de la fosfodiesterasa (PDE), reguladas, a su vez, por la subunidad alfa de la proteína G y por Ca^{2+} /CaM (calmodulina) respectivamente.⁴¹

1.5 MOTILIDAD DEL ESPERMATOZOIDE

GENERALIDADES

El espermatozoide adquiere la funcionalidad total en el tránsito por el epidídimo (maduración epididimaria y/o activación de esperma) y por el aparato reproductor femenino ó su equivalente *in vitro* (hiperactivación - capacitación espermática *in vitro*).

Activación del esperma es la capacidad que adquiere el espermatozoide de mover el flagelo en su tránsito por el epidídimo, se caracteriza por un bateo simétrico de la cola haciendo que se desplace en forma progresiva, migre a través del cérvix y útero hacia el reservorio del oviducto "el istmo", lugar donde el flagelo inicia un movimiento asimétrico, amplio y acelerado conocido como hiperactivación; produciendo movimientos en círculos para liberarse de las criptas, avanzar a través del lumen y alcanzar el ámpula. La hiperactivación se define como un fenómeno en el que se incrementa el patrón de motilidad del espermatozoide.^{42,43}

1.5.1 FACTORES DESENCADENANTES DE LA MOVILIDAD

La movilidad del esperma se desencadena por cambios en el medio iónico extracelular, por interacción con ligandos específicos y por glucosa, presentes en el líquido seminal y en el tracto reproductivo femenino; estos cambios inducen señales citosólicas flagelares, a través de la fosforilación de proteínas, de canales de Ca^{2+} y de vías dependientes de nucleótidos cíclicos (GMPc y AMPc).

⁴¹YANAGIMACHI, R (1994). The Physiology of Reproduction, Editorial Raven, Nueva York. Cap 1,2,3

⁴²BALDI E, LUCONI M, BONACCORSI L, KRAUSZ C Y FORTI G (1996). "Human sperm activation during capacitation and acrosome reaction: role of calcium, protein phosphorylation and lipid remodelling pathways". Disponible en [http://www.HUMAN_SPERM_ACTIVATION_DURING_CAPACITATION\[1\].PDF](http://www.HUMAN_SPERM_ACTIVATION_DURING_CAPACITATION[1].PDF) [23/08/10].

⁴³DARSZON Alberto (2008). "Canales, iones y como el espermatozoide interpreta los mensajes del óvulo. Disponible en www.capitulo_03.pdf" [20/05/10].



Señales extracelulares

El mayor efecto se atribuye a cationes tales como Ca^{2+} , Na^+ , K^+ y H^+ . El tránsito de estos cationes inducido por diferencias de concentración extra e intracelular, lleva a cambios en la composición iónica intracelular y subsecuentemente a cambios en el potencial funcional y de movilidad del espermatozoide.

Los ligandos específicos más conocidos son la progesterona, el esteroide sulfatado SAAF (Sperm Activating and Attracting Factor) que inducen la entrada de Ca^{2+} , el péptido activador de espermatozoide (PAS) y el péptido atrial natriurético (PAN) y que actúan, ya sea por medio de un receptor de membrana, ó por activación directa de la guanililciclase ligada a membrana (GCm).

1.5.2 SECUENCIA DE ACTIVACIÓN E HIPERACTIVACIÓN DEL ESPERMA

La activación y la hiperactivación utilizan mecanismos moleculares similares, cuyo eje funcional es el axonema y la proteína motora principal es la dineína.

La activación se desencadena cuando las señales extracelulares activan las ciclasas, lo que produce un aumento transitorio de GMPc, de AMPc y la activación de la guanilil ciclase transmembranal (GCm) o soluble (GCs). Consecutivamente se abren los canales de K^+ dependientes de GMPc, lo que provoca la salida de K^+ con la consecuente hiperpolarización de la membrana espermática dependiente de AMPc. La hiperpolarización activa el intercambiador de voltaje dependiente Na^+/H^+ con la consecuente salida de H^+ lo que induce la alcalinización del citosol y activa las dineínas.

El siguiente paso en la activación de la movilidad flagelar es la fosforilación y la desfosforilación de tirosinas, mediadas por la proteína quinasa dependiente de AMPc. La subunidad catalítica de la PKA, posee una estructura única y específica en el espermatozoide y parece que se encuentra anclada a los microtúbulos. La PKA está ubicada muy cerca al brazo de dineína externo y esto podría explicar la rápida fosforilación que sufren los polipéptidos de la cadena liviana de este brazo en el momento de la activación de la movilidad.



Estas PKA se fijan en dominios de algunas de las proteínas relacionadas con la activación y candidatas a ser fosforiladas, ellas son: hexoquinasas, AKAP (82, 220, 110, 3, 4, 97) presentes en los radios y los pares de microtúbulos externos del axonema, una proteína no caracterizada de 15 kDa en la base de flagelo y la glicógeno sintasa-quinasa.

La activación de los complejos de ensamble y de regulación de dineína; requieren de ATP que provee la fuerza necesaria para el deslizamiento entre los brazos y los microtúbulos, y la hidrólisis del mismo, junto con la ruptura de la unión entre el microtúbulo B, así la dineína garantiza que el movimiento continúe como reacción en cadena de los nueve pares de microtúbulos externos generando el movimiento en forma de bateo. Pero el incremento de la movilidad de los flagelos se asocia a dos factores adicionales como son el incremento de niveles intracelulares de AMPc y la unión de una proteína específica de la motilidad progresiva (FMP) a la superficie del espermatozoide.

Los fenómenos de fosforilación y desfosforilación se dan en forma simultánea y están asociados a la unión del brazo externo del microtúbulo A, al microtúbulo B del brazo adyacente. El espermatozoide, activado y capturado por las microvellosidades del istmo del oviducto, se capacita, y esto desencadena señales intracelulares que inducen la hiperactivación.

La hiperactivación del flagelo se debe al Ca^{2+} que se une a proteínas fijadoras en el brazo externo de la dineína, lo que induce el movimiento asimétrico. Este Ca^{2+} proviene de varias fuentes: de las reservas intracelulares de Ca^{2+} , del Ca^{2+} proveniente de la mitocondria o de la teca perinuclear y del Ca^{2+} que ingresa gracias a sistemas antiporter Na^+/H^+ y $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$.

El par de microtúbulos centrales con dominio AKAP, dirigen el plano de inclinación flagelar, enviando señales a los radios que regulan el brazo interno de dineína por medio de fosforilación/desfosforilación de proteínas; para determinar la asimetría de la onda de movimiento flagelar característica y diferencial de la hiperactivación.

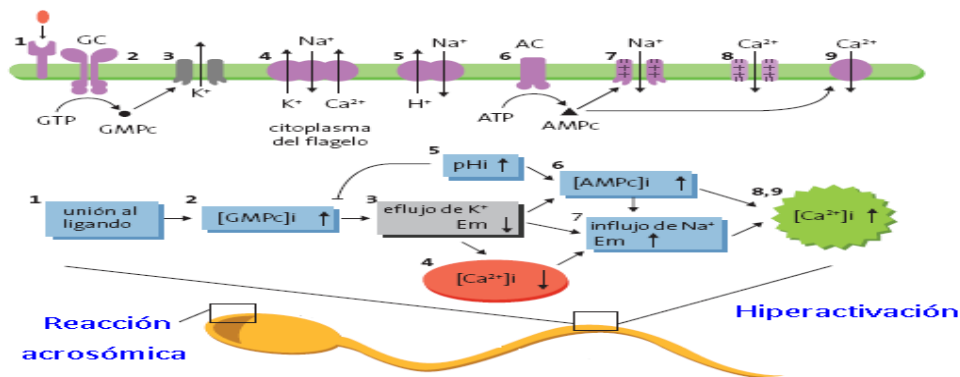


Figura N° 10. Esquema de las vías de señalización inducidas en la capacitación.

Recientemente se ha demostrado que los espermatozoides cambian su forma de nadar cuando aumenta el GMPc debido a un aumento transitorio en el Ca^{2+} citosólico.

1.5.3 CARACTERÍSTICAS DE LA CAPACITANCIA ESPERMÁTICA *in vitro*

- Aislamiento de los espermatozoides de otra células, como leucocitos y plasma seminal, para evitar el contacto con sustancias descapacitantes y tóxicas, bacterias o anticuerpos antiespermáticos
- Recuperación con diversos materiales y sustancias, para obtener mayor cantidad de espermatozoides viables.
- Incubación con medios de constitución similar a la del tracto femenino

La mayoría de estudios indican que la capacitación *in vitro* implica dos cambios funciones en el espermatozoide:

1. Capacidad de conseguir la reacción acrosómica
2. Hiperactivación ó cambios en el movimiento del flagelo y mayor amplitud de bateo de la cabeza.⁴⁴

1.5.4 CLASIFICACIÓN DE LOS MÉTODOS DE CAPACITANCIA ESPERMÁTICA.

De acuerdo con principios físicos se clasifican en cuatro grupos:

1. Migración: Swim up, Swim down, migración, sedimentación.
2. Filtración: en fibra de vidrio, en columnas cromatográficas.

⁴⁴Capacitación Espermática en el proceso reproductivo. Disponible en http://mundo-pecuario.com/tema171/fertilizacion/capacitacion_espermatica-807.html [15/07/10]



3. Centrifugación por gradientes de densidades
4. Citometría de flujo.

Las más utilizadas actualmente en los laboratorios son el swim up y el de gradientes de densidades.

1.5.5 AGENTES CAPACITANTES E INDUCTORES DE LA REACCIÓN ACROSÓMICA IN VITRO.

Yanagimachi y Chang en 1963 fueron los primeros en documentar que la capacitación no requiere un proceso *in vivo* y puede conseguirse perfectamente *in vitro*, pero el sistema usado era inconcreto y complejo, que no permitió determinar qué había causado la capacitación de los espermatozoides, más tarde Todoya con el uso de un medio químicamente definido logra una exitosa FIV, facilitando de esta manera analizar más a fondo los mecanismos de la capacitación.⁴⁵

El objetivo de los sistemas de capacitación *in vitro* es simular la secuencia de fenómenos que normalmente ocurren en el tracto reproductor femenino.⁴⁶

Posterior a muchos estudios se ha creado varios medios capaces de soportar la capacitación *in vitro*, basados en simples soluciones salinas equilibradas y/o suplementadas con fuente de energía apropiada (glucosa, lactato y piruvato), proteínas que generalmente es la albúmina sérica bovina (BSA), concentraciones de electrolitos adecuadas Na^+ , K^+ , y Ca^{2+} , e incubando en una atmósfera de CO_2 . Actualmente se conoce que incluso incubando los espermatozoides a 37°C en un medio que contenga al menos tres elementos claves: Ca^{2+} (1,5mM), HCO_3^- (25mM) y albúmina sérica bovina (10mg/ml BSA), se puede llevar a cabo la capacitación *in vitro*.⁴⁷

1.5.5.1 Modificación de la osmolaridad del medio

Existen diferentes hipótesis sobre el uso medios de alta fuerza iónica, medios hipertónicos o isoosmóticos (290 mOsm). Lo que está claramente definido es la

⁴⁵Yanagimachi R. (1994), "Mammalian fertilization. In: *Physiology of Reproduction*". Eds: Knobil E., Neill J. Raven Press, New York. Pag 189-317

⁴⁶MARTÍNEZ Belén (2002). "Estudio de fecundación *in vitro* en porcino: reducción de la poliespermia y optimización de la producción *in vitro* de embriones". Madrid. Disponible en <http://eprints.ucm.es/tesis/vet/ucm-t26293.pdf>. [23/07/10]

⁴⁷ÁLVAREZ Juan. "Cambios espermáticos previos a la fecundación". Barcelona. Disponible en [http://www.woombeuskadi.org/symposium/ponencias/15_juan_alvarez\(cambios_espermaticos\).pdf](http://www.woombeuskadi.org/symposium/ponencias/15_juan_alvarez(cambios_espermaticos).pdf) [13/07/10]



acción de los iones para desplazar o disociar las proteínas de revestimiento de la superficie del espermatozoide que inhiben la capacitación.

1.5.5.2 Modificación del pH.

Generalmente, si se exponen los espermatozoides a un pH elevado (7.8) durante al menos 40 minutos puede ocurrir dos fenómenos: disociar las proteínas de la superficie del espermatozoide e inducir la entrada de calcio hacia el interior de las células espermáticas.

1.5.5.3 Uso de albúmina sérica bovina.

La albúmina sérica bovina (BSA) en una solución salina fisiológica apropiada, favorece la eliminación del colesterol y/o zinc de los espermatozoides, debido a que esta proteína tiene capacidad ligadora (adsorbente) de ambas moléculas y por ende facilita la capacitación espermática.

1.5.5.4 Uso del ionóforo de calcio y magnesio.

El ionóforo de calcio (extracelular) incrementa el contenido de calcio intracelular de espermatozoide e induce la capacitancia y reacción acrosómica calcio dependiente.

La concentración de magnesio debe ser alta para compensar el incremento intracelular de calcio inducido por el cultivo *in vitro*.

1.5.5.5 Uso de fluido folicular y oviductal.

El fluido folicular logra capacitar e inducir la reacción acrosómica gracias a la acción de proteoglicanos de bajo peso molecular.

1.5.5.6 Heparina y otros glucosaminoglucanos(GAGS).

Los GAGS son cadenas lineales de polisacáridos usualmente unidos a un núcleo proteico conformando un proteoglicano. Estos son componentes de la matriz extracelular y se encuentran sobre las superficies celulares; también son componentes integrales de las membranas.

Varios glucosaminoglucanos como el condroitin sulfato, heparina y ácido hialurónico han sido encontrados en el tracto femenino, y considerados inductores de la capacitación, siendo la heparina la más potente probablemente por el contenido de sulfatos de esta molécula, pero cuya



capacitación declina si se emplea concentraciones elevadas de estos glicosaminoglicanos (heparina mayor a 250 $\mu\text{g/ml}$).

Los niveles de GAGs varían durante el ciclo ovulatorio de la mujer, siendo máximos durante la fase preovulatoria. Este incremento causa la disociación de glicoproteínas de superficie del espermatozoide, entre ellas la de los factores de descapacitación o estabilizadores del acrosoma adquiridos durante la eyaculación.

La heparina es un grupo heterogéneo de mucopolisacáridos aniónicos de cadena recta, llamados glucosaminoglicanos (GAGS), cuya masa molecular varía entre 8.000 y 20.000 daltons. Se le denominó heparina por su abundancia en el hígado, es empleada para la capacitación espermática *in vitro* y consiste en polímeros de dos unidades repetidas de disacáridos. Es fuertemente ácida por su contenido en grupos sulfato y ácidos carboxílicos de unión covalente.

El ácido hialurónico secretado por las células del cúmulus que rodean al ovocito es pobremente sulfatado, mientras que la heparina, heparan sulfato y dermatan sulfato son sobresulfatados.

Tanto en la heparina, como el condroitín sulfato A, B ó C y el ácido hialurónico su acción inductora estaría relacionada al grado de sulfatación de estos compuestos, siendo la heparina el GAG con mayor efecto inductor.

El mecanismo por el cual la heparina promueve la capacitación sugiere que ésta se une a proteínas de la membrana del espermatozoide procedente del plasma seminal en forma saturable dependiente del calcio, promoviendo la captación de este ión y reduciendo la concentración de la calmodulina y por ende la actividad de la Ca-ATPasa; provocando un incremento de los niveles de AMPc, y/o remueve los factores decapacitantes lo que facilitaría el influjo de calcio hacia el interior de la célula.⁴⁸

⁴⁸OLIVERA Martha y colb, (Octubre/diciembre 2006); "Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias" El espermatozoide, desde la eyaculación hasta la fertilización, vol.19 no.4 Medellín. Disponible en <http://www.scribd.com/doc/15280348/Fecundacion>, www.scielo.unal.edu.co/scielo.php [26/06/10]



1.5.5.7 Papel de los b- aminoácidos y proteínas

Los B aminoácidos, como los sulfonados, taurina y su precursor la hipotaurina están presentes en el fluido seminal y oviductal, de entre estos, la hipotaurina junto con la epinefrina incrementan la motilidad de los espermatozoides, ya que limitan la formación de superóxidos, e inhibe la peroxidación de los lípidos de los espermatozoides.

Los aminoácidos, gracias a su poder quelante, son capaces de secuestrar iones metálicos y otras sustancias perjudiciales para el gameto, evitando que ejerzan su acción tóxica.

Por otra parte, tienen la cualidad de captar protones que, unido a los elevados niveles de aminoácidos en el interior de los gametos, hace pensar en la posibilidad de que ciertos aminoácidos actúen como tampones del pH intracelular, uniéndose a iones H^+ y transportándolos hacia el exterior de la membrana celular, cuyo mantenimiento es fundamental para minimizar el estrés homeostático y metabólico responsable de la pérdida de viabilidad.

También se ha considerado que sirven como fuente de energía y pool para la síntesis proteica.

Taurina y EDTA: protegen de la oxidación.

1.5.5.8 Fructosa, glucosa, lactato y piruvato.

Durante la capacitación el espermatozoide sufre cambios a nivel metabólico, que conducen a su activación, siendo necesario la utilización de moléculas como fructosa, glucosa, piruvato y lactato como fuente de energía.

1.5.6 FACTORES QUE AFECTAN LA CAPACITACIÓN *IN VITRO*

1.5.6.1 Temperatura

La capacitación es un proceso dependiente de la temperatura, por lo que un proceso *in vitro* necesita de una incubación a 37°C; una pequeña diferencia de temperatura puede ocasionar grandes alteraciones del estado físico de los lípidos de las membranas, de la estructura, por tanto puede afectar a la funcionalidad de los espermatozoides.



1.5.6.2 Uso de semen fresco o congelado

El semen fresco requiere mayor tiempo de incubación que el congelado, debido a que los espermatozoides congelados-descongelados se deterioran más rápido que los frescos, pudiendo ser el diluyente empleado para congelar los espermatozoides un factor que afecte la capacitación.

La recuperación de la supervivencia espermática post-descongelación, depende en gran parte del método de descongelación. La velocidad de descongelación es uno de los factores más importantes que afectan a la viabilidad espermática. Los espermatozoides que han sobrevivido a la congelación a -196°C enfrentan una fase de calentamiento y descongelación, y para esto deben atravesar nuevamente las dos temperaturas críticas.

A una velocidad de descongelación rápida, el espermatozoide se expone por un tiempo más corto al soluto concentrado y al crioprotector, esto hace que la restauración del equilibrio intra-extracelular sea más rápida que en la descongelación lenta.

1.5.6.3 Composición del medio de capacitación in vitro

Todos los componentes del medio deben contribuir directa o indirectamente en la capacitación, sin embargo la ausencia o presencia de algún componente en particular puede no ser crítica, si el resto de componentes y energía endógena pueden soportar la viabilidad de los espermatozoides.

De acuerdo a ciertas experimentaciones se ha demostrado que en medios deficientes en K^+ , CA^{2+} , HCO_3^- , sustratos energéticos exógenos, albúmina o incluso Na^+ y Cl^- la capacitación puede ocurrir.^{49,50}

⁴⁹ URBINA, LERNER, BIBER (2008). "Fertilidad y Reproducción Asistida". Editorial Panamericana, Caracas-Venezuela, cap 46.

⁵⁰ Martínez Belén (2002), "Estudio de la fecundación "in vitro" en porcino: reducción de la poliespermia y optimización de la producción "in vitro" de embriones", Madrid. Disponible en <http://ucm-t26293.pdf>



CAPITULO II

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 HIPÓTESIS

La hipótesis planteada para la ejecución de este proyecto es la siguiente: ¿Con la Técnica Swim up se recuperará igual ó mayor porcentaje de espermatozoides con movimiento progresivo rápido, que con la de gradientes de densidades?.

2.2 OBJETIVOS

2.2.1 Objetivo general

Evaluar la técnica Swim Up frente a la de gradientes de densidad empleadas en la capacitación espermática, con fines de optimizar el diagnóstico y tratamiento.

2.2.2 Objetivos específicos

- Definir las técnicas Swim Up y Gradientes de densidades para la capacitación espermática.
- Establecer un protocolo experimental para la capacitación espermática.
- Evaluar y comparar los resultados de las técnicas empleadas

2.3 ENTREVISTA Y CONSENTIMIENTO

A los pacientes que accedieron a la investigación se indagó sobre su edad y actividad laboral, hábitos de consumo de alcohol, cigarrillo, medicamentos, tratamientos anteriores, cuya información orienta a una pre impresión diagnóstica, además debieron firmar un consentimiento que asiente que han sido informados del procedimiento, y que aceptan participar de forma voluntaria en este proyecto.



2.4 VARIABLES

Las variables de esta investigación son la determinación cuantitativa de la concentración y movilidad de los espermatozoides en muestras de semen; cuyos resultados se clasifican en dos categorías:

1) PRE CAPACITANCIA: correspondiente al análisis inicial de las variables en la muestra de semen (Espermograma).

2) POST CAPACITANCIA: correspondiente al análisis de las variables en la muestra de semen, luego de realizado la respectiva técnica de capacitación espermática.

2^a. Swim Up

2^b. Gradientes de Densidades

2.5 MATERIALES Y MÉTODOS

La presente investigación es un estudio de campo, descriptivo, cuasi experimental, realizado en la Clínica de Medicina Reproductiva y Ginecología BioGEPA.

2.5.1 MUESTREO

El muestreo se basó en la teoría matemática-estadística, que para efectos del mismo tomó en consideración los siguientes criterios: universo de 107 pacientes que se realizaron una capacitación espermática en la clínica Bio GEPA durante el año 2009, 5% de error.

Fórmula:

$$n = \frac{N}{e^2 (N - 1) + 1} = \frac{107}{0.05^2 (107 - 1) + 1} = 85 \text{ muestras en un año}$$

Donde:

n: número de muestra

N: universo

e: error

Procurando que la muestra sea representativa de la población de pacientes que acuden a la clínica para este procedimiento, se estimó 4 meses para toma



de muestras de acuerdo al juicio y opinión del investigador, debiéndose recolectar 28 muestras para el estudio.

Para la ejecución de esta investigación se efectuó la evaluación por los dos procedimientos mencionados en muestras de 28 pacientes de sexo masculino, cuyas edades están comprendidas entre los 18 y 50 años, que no han logrado conjuntamente con su pareja concebir; y que acudieron a la clínica BioGepa con la solicitud del examen de capacitancia.

2.5.1.1 TOMA DE MUESTRAS

La toma de muestras para la evaluación de los métodos de capacitancia espermática, contó con el apoyo de la Clínica BioGEPA y profesionales del área de andrología.

La obtención de muestras fue realizada durante el período programado por la clínica para llevar a cabo las técnicas de reproducción asistida, recolectando 28 eyaculados de pacientes varones, las mismas que se pretende emplear en los tratamientos homólogos o heterólogos.

El protocolo a seguir fue el siguiente:

- A los pacientes que acudieron a la oficina del laboratorio de andrología, con la solicitud del exámen de capacitancia espermática, se les entrega información escrita sobre los requisitos para la toma de muestra; una vez estén en las condiciones requeridas pueden obtener el espécimen.

INFORMACIÓN DE REQUISITOS PARA LA TOMA DE MUESTRA
<ul style="list-style-type: none">• Respetar un período de abstinencia sexual de 2-7 días.• No ingesta de medicamentos• No tener fiebre• Recoger la muestra solamente mediante masturbación, directamente en un envase de plástico y estéril.• No contaminar las partes internas del frasco recolector.• No usar preservativos normales, porque contienen lubricantes y espermicidas.• Observar que el recipiente este correctamente identificado.• Si se recoge la muestra de semen en casa no demorarse más de 45 minutos hasta la entrega en el laboratorio.• Indicar a quién entrega la muestra, sí ha tenido algún problema en la



obtención de la misma. (si no recogió completo ó se regó).

- El día de obtención de la muestra, se indaga los datos necesarios para la identificación de la misma (Nombre del paciente, edad, días de abstinencia y nombre de su esposa cuando corresponda), así como, el cumplimiento de los requisitos descritos textualmente.
- Luego de una explicación verbal de la metodología de obtención del semen, se les proporciona el frasco recolector a cada uno; posterior a esto se les conduce a la sala de obtención de muestras, cuya área está diseñado y acondicionada para dicho fin.

METODOLOGÍA PARA LA RECOLECCIÓN DE SEMEN

- Antes de proceder a la obtención de la muestra debe lavarse minuciosamente las manos con agua y jabón, secarse las manos con papel absorbente.
- Luego desprender la bolsa plástica que envuelve el recipiente estéril
- Desenroscar la tapa del recipiente.
- Retirar el prepucio y lave la zona con agua tibia
- Recoger la muestra de semen en el recipiente y ciérrelo.
- Entregar la muestra de semen al personal del laboratorio de andrología.

- Una vez finalizada la toma de cada una de las muestras, se traslada adecuadamente al laboratorio de andrología de la Clínica BioGEPA, para su análisis.



2.5.1.2 OBTENCIÓN Y PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

FIV e ICSI: Puede ser recolectada en el tránsito de cuatro horas luego del ingreso de su esposa al quirófano, para la aspiración de los ovocitos, siendo este tiempo el necesario para preparar la muestra conjuntamente con los ovocitos aspirados.

Inseminación Artificial: se recolecta la muestra una hora antes de llevarse a cabo este procedimiento, con el fin de tener listo el semen capacitado e inocular sin demora luego de haber ubicado la guía al interior del útero.

Diagnóstico: se pueden usar muestras recogidas en cualquier momento del día, pero deben ser entregadas al laboratorio para su análisis antes de 30-45 minutos.

No se puede recolectar la muestra por coitus interruptus, debido a los siguientes problemas:

- Se puede perder la primera fracción del eyaculado y por ende la mayor concentración de espermatozoides.
- Dar lugar a una contaminación bacteriana y celular
- El pH ácido del flujo vaginal afecta negativamente a la motilidad de los espermatozoides.

2.5.2 PRINCIPIOS DE LAS TÉCNICAS DE CAPACITANCIA

2.5.2.1 FUNDAMENTOS DE LA TÉCNICA "GRADIENTES DE DENSIDADES"

Esta técnica de capacitación se basa en el principio de sedimentación-centrifugación de células según sus gradientes de densidad.

Las células sedimentan en un gradiente que se encuentra en equilibrio equivalente con su propia densidad; permitiendo seleccionar a los espermatozoides que pueden vencer la dificultad que presentan los gradientes de densidad y llegar hasta el fondo del tubo, además de actuar como filtro para el plasma seminal, células redondas, detritos y aquellos espermatozoides con movilidad no progresiva.



La Teoría básica de la sedimentación describe que:

- La velocidad de sedimentación de cada partícula es proporcional a su tamaño, a la densidad de la partícula y a la del medio.
- Es nula cuando ambas densidades se igualan.
- Disminuye al aumentar la viscosidad del medio.
- Aumenta al incrementar el campo de fuerza.⁵¹

La centrifugación es un proceso de separación de partículas suspendidas en un medio tras la aplicación de una fuerza (Fuerza centrífuga relativa), provista por la rotación de una centrifuga a determinada velocidad ó revoluciones por minuto.

La fuerza ejercida sobre las partículas (en comparación con la gravedad) se llama Fuerza Centrífuga Relativa (FCR). Por ejemplo, una FCR de 500 x g indica que se aplica una fuerza centrífuga 500 veces mayor a fuerza gravitacional de la tierra (9.8).⁵²

CLASIFICACIÓN DE LA CENTRIFUGACIÓN

Analítica
Preparativa

{ Diferencial
Con gradiente de densidades

{ Zonal
De equilibrio (isopícnica)

La centrifugación preparativa indica que cuando el rotor de una centrifuga gira, la fuerza centrífuga actúa sobre cada una de las partículas de la muestra. A su vez la sedimentación proporcionada por esta fuerza aplicada, está influenciada por las propiedades físicas de cada una de las partículas presentes en la solución (forma, tamaño, densidad) y por la viscosidad de la solución en la que se encuentra la muestra.

⁵¹Técnicas Galeón- Centrifugación, disponible en <http://www.galeon.com/lactobacilo/tecnicas.htm>. [23/08/10]

⁵² Cole-Parmer Technical Library, Conceptos básicos de centrifugación, disponible en http://www.coleparmer.com/techinfo/techinfo.asp?htmlfile=basiccentrifugation_SP.htm&ID=910. [22/08/10]



Un gradiente de densidad, es un solvente con diferentes concentraciones dispuestos en una columna en donde la parte inferior contiene el solvente con mayor densidad, y mientras más se acerca a la parte superior disminuyen la densidad. El fluido del gradiente de densidad consiste de un adecuado soluto de bajo peso molecular en un solvente en el cual las partículas de la muestra pueden ser suspendidas.

CLASIFICACIÓN DE LOS GRADIENTES DE DENSIDADES

No lineales
Lineales: discontinuos y/o continuos

Los métodos de gradientes discontinuos: consisten en colocar la capa más densa en el fondo del tubo, seguida de capas de menor densidad; evitando efectos de mezcla y oclusión de aire; y la muestra en la parte superior del gradiente preformado.

Medio empleado para construir los gradientes:

Para esta técnica se emplea sustancias coloidales que permiten una preparación isopícnica de espermatozoides, como partículas de sílica cubiertas con polivinilpirrolidona (PVP), así provee un medio con alta gravedad específica que al tener una baja viscosidad no retarda la sedimentación. Aunque en la actualidad hay diversas sustancias que se emplean para construir gradientes discontinuos (sacarosa, ficoll, percoll ó all grad)

All Grad. Suspensión de partículas (5.15 nm) de ácido silícico revestidas de un derivado de polivinilo que presenta baja viscosidad a densidades altas, no afecta prácticamente a la presión osmótica del medio y es estable a pH comprendidos entre 5 y 10. La polivinilpirrolidona no debe sobrepasar el 2%, porque cantidades superiores ha sido señaladas como responsables de efectos tóxicos sobre la producción de blastocistos. Por lo general se emplean 2 a 3 gradientes compuestos por soluciones con diferentes porcentajes de concentración: 2 capas (40% y 80%) y 3 capas (50%, 70% y 95%).



Metodología de la técnica "Gradientes de densidades":

La metodología que se sigue para esta técnica contempla el depósito en un tubo cónico en forma secuencial y decreciente de los gradientes, según su densidad y luego se añade el semen en un volumen equivalente al de las gradientes. Por el efecto de la fuerza de gravedad, los espermatozoides se alinean orientando sus cabezas hacia el fondo del tubo y se desplazan hacia los gradientes que sean isopícnicos y permanecen en estos. Así en los gradientes de más alta densidad se concentran los espermatozoides con mejor movilidad y morfología. El resto de los constituyentes del semen se acumulan en el gradiente de su misma densidad.⁵³

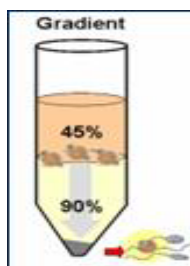


Figura Nº 11. Representación de la técnica "Gradientes de densidades"

2.5.2.2 FUNDAMENTO DE LA TÉCNICA "SWIM UP"

La técnica de swim-up fue desarrollada por Parrish y col. en 1984 y se basa en la capacidad migratoria de los espermatozoides, para trasladarse desde el pellet hacia el medio de cultivo y posteriormente ser separados, así sólo los espermatozoides con buena movilidad podrán ascender al sobrenadante.

El ascenso de los espermatozoides en el tubo de Swim up, está directamente relacionado con la temperatura y el tiempo de incubación, pero principalmente la selección es dependiente del nivel de motilidad de los espermatozoides, así en la superficie del medio estarán los que se mueven mejor y más rápidos.

En esta técnica el semen licuado es colocado debajo del medio de cultivo y durante un período de incubación a 39°C, los espermatozoides móviles migran hacia el medio de cultivo.⁵⁴

⁵³CIGOR, Reproducción asistida, Método de separación de los espermatozoides móviles. Disponible en http://www.cigorcentro.com.ar/index.php?s=lab_proced_muestras. [23/08/10].

⁵⁴ PAMA Gustavo A (2010.) Técnicas de capacitación espermática, Disponible en www.procrear.com.pe/fertilab.php[22/08/10]

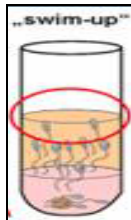


Figura Nº 12. Representación de la técnica de capacitancia Swim up

Purvis y Egdetveit (1993) demostraron que colocando los tubos en un ángulo de 30° , en lugar de colocarlos verticalmente, la recuperación de espermatozoides aumentaba en un 50-100%, probablemente debido a que este ángulo permite extender la superficie de medio y disminuir la altura que los espermatozoides deben ascender.⁵⁵

2.5.3 REACTIVOS: Ver anexos ⁵⁶

2.5.4 MATERIALES

Porta y cubre objetos, pipetas pasteur $\frac{3}{4}$, capuchón de caucho, tubos falcon, tubos para transferencia, gradilla con ángulo de inclinación de 45° , cámara makler, microscopio de contraste de fase, incubadora, centrifuga, fichas de evaluación, recolector de orina, cronómetro.

2.5.5 PROCEDIMIENTO DE LAS PRUEBAS

PROCESOS REALIZADOS EN EL LABORATORIO DE ANDROLOGÍA

A 15 minutos de producido la licuefacción se realiza un espermograma. Dentro de este examen los parámetros requeridos por motivo de este estudio son: concentración y movilidad.

Finalizado el espermograma se realiza la capacitancia de espermatozoides por los dos métodos.

⁵⁵PALMA Gustavo A (2001), Biotecnología de la reproducción- principios de Swim Up, Ediciones: instituto nacional de tecnología agropecuaria, Argentina, 1ªedición, pag 240-260.

⁵⁶An IVFonline Company (2010), All Grad. Disponible en http://www.lifeglobal.com/assets/PDF/AG-Broch-Mar12_2010.pdf. [22/08/10]



2.5.5.1 PROCEDIMIENTO DE GRADIENTES DE DENSIDADES

1. Hacer deslizar un volumen determinado (1ml) de medio de gradiente al 90% impregnando las paredes hasta el fondo de un tubo cónico falcon.
2. A continuación, depositar el mismo volumen determinado de gradiente al 45%, el cual se deja caer lentamente para evitar que se mezclen y se rompa la interfase entre ellos.
3. Depositar 1ml de semen haciéndolo también deslizar suavemente sobre la pared del tubo.
4. Centrifugar a 500 gravedades (aproximadamente 5000 rpm) durante 10 minutos y posteriormente, con una pipeta Pasteur 3/4, recuperar el sedimento.
5. Preparar medio global hepes al 10%: colocar en un tubo falcon 2.7ml global hepes con 0.3ml de albúmina y homogenizar
6. Depositar el sedimento recuperado sobre el medio descrito en el paso anterior, homogenizar y centrifugar a 500 gravedades durante 5 minutos.
7. Eliminar el sobrenadante con la ayuda de una pipeta pasteur $\frac{3}{4}$ y resuspender el botón con un volumen de 0.3-0.5 ml de medio de cultivo.
8. Evaluar la muestra homogenizada (parámetros de concentración y movilidad), proceder a la preparación de la cánula o dejarlo en el incubador a 37°C hasta su utilización en IAI, FIV y/o ICSI.

2.5.5.2 PROCEDIMIENTO DE SWIM UP

Equilibrar el medio Global y la proteína suplementada a la temperatura ambiente antes de su uso.

1. Utilizar una pipeta estéril para trasvasar 1 ml de de semen licuado a un tubo centrifugador de fondo circular estéril (tubo de aspiración).
2. Preparar medio global hepes al 10%: colocar en un tubo falcon 0.9 ml global hepes con 0.1ml de proteína suplementada y homogenizar
3. Depositar suavemente 1ml de medio global al 10%, utilizando una nueva pipeta estéril, sobre el tubo de aspiración que contiene el espécimen.
4. Sin deshacer las capas, colocar el tubo centrifugador y su contenido en un ángulo de 45° en la incubadora a 37°C durante 30 minutos.



Los espermias móviles migrarán hacia el medio.

5. Con cuidado extraer con una pipeta Pasteur 0,2- 0,3 ml de la parte superior del medio (sobrenadante) que contiene espermias con movilidad grado III.
6. Colocar los 0,3 ml de fluido en un tubo cónico estéril. Ahora la muestra de espermia está lista para analizar o usar.⁵⁷

2.5.6 INTERPRETACIÓN DE LAS PRUEBAS

DETERMINACIÓN DE CONCENTRACIÓN

La concentración espermática es la cantidad de espermatozoides que se encuentran en una unidad de volumen. Existen diferentes cámaras para este fin, entre ellas la cámara makler que cuenta con una cuadrícula de 1 mm² dividida en 100 cuadros, con una profundidad de 10 µm. Los espermatozoides contados en 10 de estos cuadros corresponden a una concentración de millones por mililitro. Este parámetro presenta mucha variabilidad en un mismo individuo, por lo que es imprescindible realizar dos o tres espermogramas, si el examen se ha realizado como fin diagnóstico.

La concentración de espermatozoides por ml de semen y/o por eyaculado son parámetros que permiten evaluar la calidad del eyaculado. La ausencia de espermatozoides en el eyaculado puede ser evidencia de una eyaculación retrograda (azoospermia), bloqueo de las vías seminales (azospermia obstructiva), falla en la producción testicular (azoospermia secretora).

Para determinar la concentración de espermatozoides colocamos 10µl de semen licuado sobre el orificio destinado en la cámara makler, teniendo cuidado de no sobrellenar la misma; se observa en el microscopio con óptica de contraste de fase, empleando el lente 10x, por último se cuantifica su concentración. Este procedimiento se realiza por duplicado.

Si en la observación inicial no se encuentra ningún espermatozoide, se debe centrifugar la muestra y observar detenidamente el sedimento entre porta y cubreobjetos para diagnosticar a una muestra como azoospermica.

⁵⁷NÚÑEZ ACEVEDO Néstor, Capacitación de espermatozoides. Disponible en http://distritos.telepolis.com/1417/lib/Infertilidad_masculina/capacitacion.htm [22/08/10]



DETERMINACIÓN DE LOS DIFERENTES GRADOS DE MOVILIDAD

La valoración de este parámetro, se la lleva a cabo al mismo tiempo que la determinación de la concentración, esto permite conocer la concentración de espermatozoides con diferentes grados de movilidad, pero principalmente los de grado tres, cuyo interés es el empleo en las técnicas de reproducción asistida.

Los espermatozoides se clasifican en cuatro categorías en función de su movilidad:

CATEGORIA	A ó III	B ó II	C ó I	D ó O
DEFINICIÓN	Móviles progresivos rápidos.	Móviles progresivos lentos	Móviles No progresivos	Inmóviles
TIPO DE DESPLAZAMIENTO	Rectilíneo o rápido.	Rectilíneo ó en curvas y lento.	Movimiento in situ de cabeza o flagelo, pero no se desplazan.	No se mueven, ni se desplazan.

Tabla № 8: Clasificación de los espermatozoides según su movilidad

Para llevar a cabo el análisis de movilidad se debe contar:

- Los espermatozoides libres y no aquellos que estén agregados entre sí ó a otras células.
- Espermatozoides móviles e inmóviles en varios campos seleccionados al azar.
- 100 espermatozoides en total.
- Primero los espermatozoides progresivos, luego los no progresivos y finalmente los inmóviles.

El resultado se expresa en porcentaje de espermatozoides, de las cuatro categorías descritas.



CAPÍTULO III

3. RESULTADOS y ANÁLISIS

En este capítulo se darán a conocer los resultados obtenidos por los dos métodos de capacitancia espermática realizados en la clínica BioGEPA, y su correspondiente análisis e interpretación.

Para el análisis de datos, se emplearon los siguientes procedimientos y técnicas:

1. Los resultados de las capacitancias fueron registrados en una bitácora para su posterior ingreso en una base computarizada con la respectiva codificación; tomando en cuenta los siguientes parámetros:
 - Concentración total de espermatozoides por mililitro
 - % Movilidad grado III.
 - Concentración grado III de espermatozoides por mililitro.
 - Volumen empleado en las técnicas de capacitancias.
 - Volumen remanente posterior a la aplicación de las técnicas.
2. En la interpretación estadística se utilizó la prueba F, para la cual se determinó las covarianzas de los porcentajes de recuperación de espermatozoides grado III obtenidos con cada técnica.
Para aceptar o rechazar la hipótesis planteada fue necesario comparar F_{cal} con el $F_{crít}$ (tablas preestablecidas), tomando en consideración los grados de libertad del numerador y denominador.
3. Para la representación de los datos se utilizaron tablas y gráficas con sus respectivas interpretaciones.
4. Finalmente se realizaron las correspondientes conclusiones y recomendaciones pertinentes.



3.1 RESULTADOS DE LA DETERMINACIÓN DE LABORATORIO

Tabla N° 9: Resultados de la concentración espermática total pre y post capacitancia espermática ensayadas en semen eyaculado de 28 pacientes que acudieron a la clínica BioGEPA.

CONCENTRACIÓN ESPERMÁTICA TOTAL (espermatozoides/ml)			
Pre Capacitancia		Post Capacitancia	
Pre Espermática		Post Espermática	
Nº Muestra	Muestra Inicial	Gradientes de Densidades	Swim Up
1	2-3/c	2-3/c	0
2	80.000.000	30.000.000	40.000.000
3	25.000.000	1.000.000	250.000
4	45.000.000	5.000.000	100.000
5	70.000.000	5.000.000	200.000
6	1.000.000	100.000	2-3/c
7	40.000.000	15.000.000	25.000.000
8	70.000.000	20.000.000	35.000.000
9	20.000.000	50.000.000	300.000
10	80.000.000	500.000	200.000
11	3.000.000	100.000	3.000
12	5.000.000	1.000.000	200.000
13	70.000.000	25.000.000	14.000.000
14	35.000.000	2.000.000	100.000
15	50.000.000	20.000.000	25.000.000
16	100.000.000	15.000.000	8.000.000
17	45.000.000	3.000.000	600.000
18	15.000.000	3.000.000	1.000.000
19	100.000.000	30.000.000	8.000.000
20	25.000.000	10.000.000	5.000.000
21	1-2/c	2-3/c	0
22	70.000.000	10.000.000	6.000.000
23	80.000.000	20.000.000	9.000.000
24	15.000.000	4.000.000	2.500.000
25	50.000.000	15.000.000	4.500.000
26	45.000.000	25.000.000	12.000.000
27	130.000.000	150.000.000	50.000.000
28	2.200.200	1.700.000	50.000



Tabla Nº10: Resultados obtenidos con la técnica gradientes de densidades

GRADIENTES de DENSIDADES (espermatozoides/ml)			
Nº Muestra	Concentración total	Motilidad III (%)	Concentración III
1	2-3/c	<1	0
2	30.000.000	90	27.000.000
3	1.000.000	30	300.000
4	5.000.000	5	250.000
5	5.000.000	5	250.000
6	100.000	1	1.000
7	15.000.000	90	13.500.000
8	20.000.000	90	18.000.000
9	50.000.000	1	500.000
10	500.000	70	350.000
11	100.000	5	5.000
12	1.000.000	30	300.000
13	25.000.000	70	17.500.000
14	2.000.000	5	100.000
15	20.000.000	90	18.000.000
16	15.000.000	80	12.000.000
17	3.000.000	30	900.000
18	3.000.000	40	1.200.000
19	30.000.000	40	12.000.000
20	10.000.000	60	6.000.000
21	2-3/c	<1	0
22	10.000.000	70	7.000.000
23	20.000.000	70	14.000.000
24	4.000.000	50	2.000.000
25	15.000.000	60	9.000.000
26	25.000.000	75	18.750.000
27	150.000.000	58	87.000.000
28	1.700.000	5	85.000



Tabla N°11: Resultados obtenidos con la técnica Swim Up

SWIM UP (espermatozoides/ml)			
Nº Muestra	Concentración total	Motilidad III(%)	Concentración grado III
1	0	0	0
2	40.000.000	90	36.000.000
3	250.000	80	200.000
4	100.000	100	100.000
5	200.000	90	180.000
6	2-3/c	100	2-3/c
7	25.000.000	90	22.500.000
8	35.000.000	80	28.000.000
9	300.000	90	270.000
10	200.000	95	190.000
11	3.000	80	2.400
12	200.000	95	190.000
13	14.000.000	90	12.600.000
14	100.000	85	85.000
15	25.000.000	100	25.000.000
16	8.000.000	80	6.400.000
17	600.000	100	600.000
18	1.000.000	90	900.000
19	8.000.000	80	6.400.000
20	5.000.000	85	4.250.000
21	0	0	0
22	6.000.000	90	5.400.000
23	9.000.000	100	9.000.000
24	2.500.000	90	2.250.000
25	4.500.000	100	4.500.000
26	12.000.000	95	11.400.000
27	50.000.000	95	47.500.000
28	50.000	100	50.000



Tabla N° 12: Resultados de concentración grado III Pre y post capacitancia espermática

CONCENTRACIÓN GRADO III (espermatozoides/ml)			
PRE CAPACITANCIA		POST CAPACITANCIA	
Nº Muestra	Muestra Inicial	Gradientes de Densidades	Swim Up
1	200	0	0
2	80.000.000	27.000.000	36.000.000
3	25.000.000	300.000	200.000
4	45.000.000	250.000	100.000
5	70.000.000	250.000	180.000
6	1.000.000	1.000	2,5
7	40.000.000	13.500.000	22.500.000
8	70.000.000	18.000.000	28.000.000
9	20.000.000	500.000	270.000
10	80.000.000	350.000	190.000
11	3.000.000	5.000	2.400
12	5.000.000	300.000	190.000
13	70.000.000	17.500.000	12.600.000
14	35.000.000	100.000	85.000
15	50.000.000	18.000.000	25.000.000
16	100.000.000	12.000.000	6.400.000
17	45.000.000	900.000	600.000
18	15.000.000	1.200.000	900.000
19	100.000.000	12.000.000	6.400.000
20	25.000.000	6.000.000	4.250.000
21	100	0	0
22	70.000.000	7.000.000	5.400.000
23	80.000.000	14.000.000	9.000.000
24	15.000.000	2.000.000	2.250.000
25	50.000.000	9.000.000	4.500.000
26	45.000.000	18.750.000	11.400.000
27	130.000.000	87.000.000	47.500.000
28	2.200.200	85.000	50.000



Tabla N°13: Volumen obtenido posterior a la aplicación de las técnicas de capacitancia espermática.

Nº Muestra	VOLUMEN INICIAL (ml)	VOLUMEN FINAL	
		Gradientes (ml)	Swim Up (ml)
1	1	0,2	0,2
2	1	0,3	0,2
3	1	0,2	0,2
4	1	0,2	0,2
5	1	0,2	0,2
6	1	0,2	0,3
7	1	0,2	0,2
8	1	0,3	0,2
9	1	0,2	0,2
10	1	0,3	0,2
11	1	0,2	0,3
12	1	0,2	0,2
13	1	0,3	0,2
14	1	0,2	0,2
15	1	0,2	0,2
16	1	0,2	0,2
17	1	0,2	0,2
18	1	0,2	0,2
19	1	0,2	0,2
20	1	0,2	0,2
21	1	0,2	0,3
22	1	0,2	0,2
23	1	0,2	0,2
24	1	0,2	0,2
25	1	0,2	0,2
26	1	0,2	0,2
27	1	0,2	0,2
28	1	0,2	0,2



Tabla N°14: Porcentaje de Motilidad grado III pre y post capacitancia espermática.

PORCENTAJE MOTILIDAD GRADO III			
Pre capacitancia		Post capacitancia	
Nº Muestra	Muestra Inicial (%)	Gradientes de densidades (%)	Swim Up (%)
1	1	<1	0
2	40	90	90
3	10	30	80
4	5	5	100
5	3	5	90
6	3	1	100
7	30	90	90
8	30	90	80
9	1	1	90
10	10	70	95
11	5	5	80
12	2	30	95
13	35	70	90
14	15	5	85
15	50	90	100
16	45	80	80
17	30	30	100
18	10	40	90
19	10	40	80
20	20	60	85
21	1	<1	0
22	40	70	90
23	15	70	100
24	10	50	90
25	15	60	100
26	10	75	95
27	45	58	95
28	1	5	100



Tabla N°15. Clasificación de las muestras de semen según su calidad (movilidad, concentración).

CLASIFICACIÓN DE LAS MUESTRAS DE SEMEN ANALIZADAS			
Nº Muestra	Normozoospermicas	Oligoastenozoospermicas	Astenozoospermicas
1		*	
2	*		
3			*
4			*
5			*
6		*	
7	*		
8	*		
9			*
10			*
11		*	
12		*	
13	*		
14			*
15	*		
16	*		
17	*		
18		*	
19			*
20			*
21		*	
22	*		
23			*
24			*
25			*
26			*
27	*		
28		*	



Tabla N° 16: Clasificación de muestras de semen según su calidad

Clases de semen	Número total de Muestras	%
Normozoospermica	9	32
oligoastenozoospermica	7	25
Astenozoospermica	12	43
Total	28	100

Fuente: tabla N° 9, 12, 14,15.

PORCENTAJE DE RECUPERACIÓN ESPERMÁTICA

El porcentaje de recuperación espermática asiste a la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Recuperación espermática} = \frac{(v * c * m)}{(V * C * M)}$$

Donde:

v: volumen final de la preparación

c: concentración total en la preparación

m: % de espermatozoides móviles grado III en la preparación

V: volumen final en el semen

C. concentración total en el semen

M: % de espermatozoides móviles grado III en el semen

NOTA: Los datos de las tablas N° 9, 13 y 14 sirvieron de base para el cálculo del porcentaje de recuperación espermática.



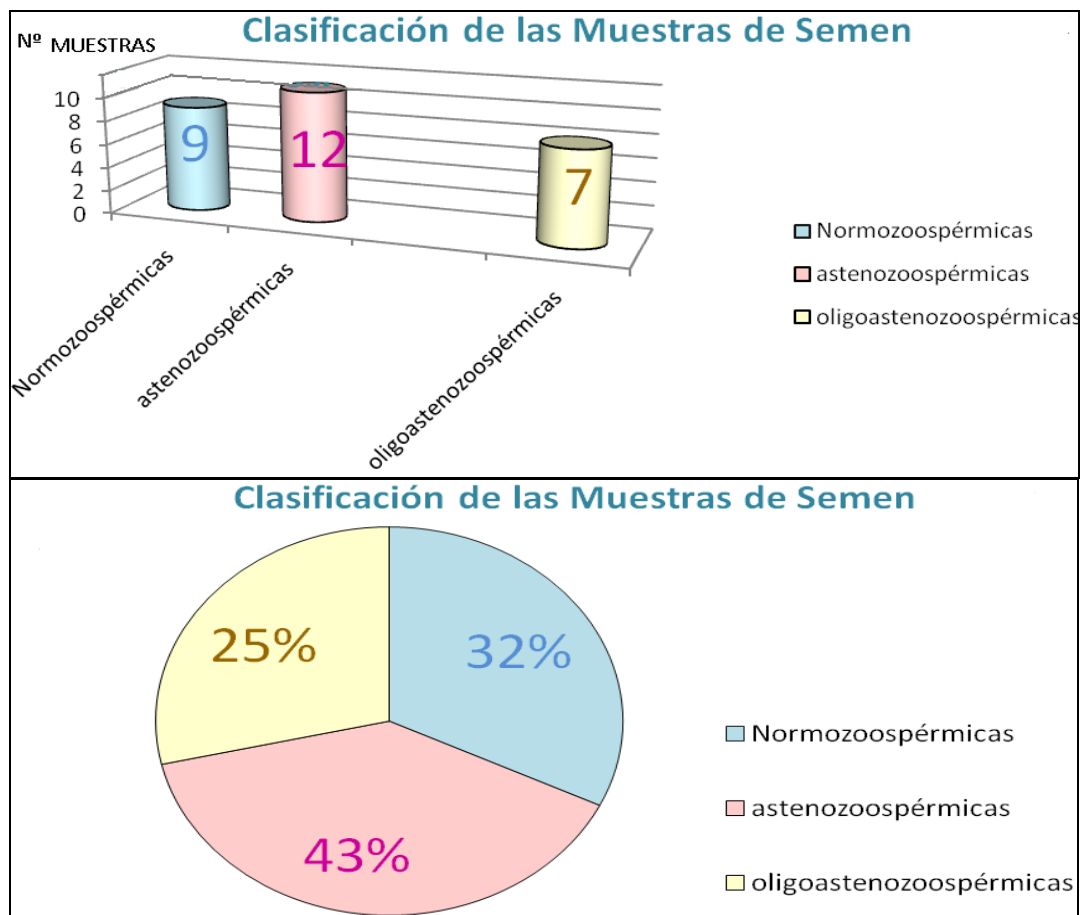
Tabla Nº 17. Porcentaje de recuperación de espermatozoides grado III Post capacitancia espermática, resultante de la aplicación de las dos técnicas.

% PORCENTAJE DE RECUPERACIÓN DE ESPERMATOZOIDES GRADO III					
Nº Muestra	Gradientes de Densidades	Swim Up	Nº Muestra	Gradientes de Densidades	Swim Up
1	20,0000	0,0000	15	14,4000	20,0000
2	25,3125	22,5000	16	5,3333	2,8444
3	2,4000	1,6000	17	1,3333	0,8889
4	2,2222	0,8889	18	16,0000	12,0000
5	2,3810	1,7143	19	24,0000	12,8000
6	0,6667	0,0025	20	24,0000	17,0000
7	22,5000	37,5000	21	33,3333	0,0000
8	25,7143	26,6667	22	5,0000	3,8571
9	50,0000	27,0000	23	23,3333	15,0000
10	1,3125	0,4750	24	26,6667	30,0000
11	0,6667	0,4800	25	24,0000	12,0000
12	60,0000	38,0000	26	83,3333	50,6667
13	21,4286	10,2857	27	29,7436	16,2393
14	0,3810	0,3238	28	77,2657	45,4504



3.2 GRÁFICAS E INTERPRETACIONES DE LOS RESULTADOS

Figuras N° 13 y 14. Clasificación de las muestras de semen, según el número de casos y porcentaje.

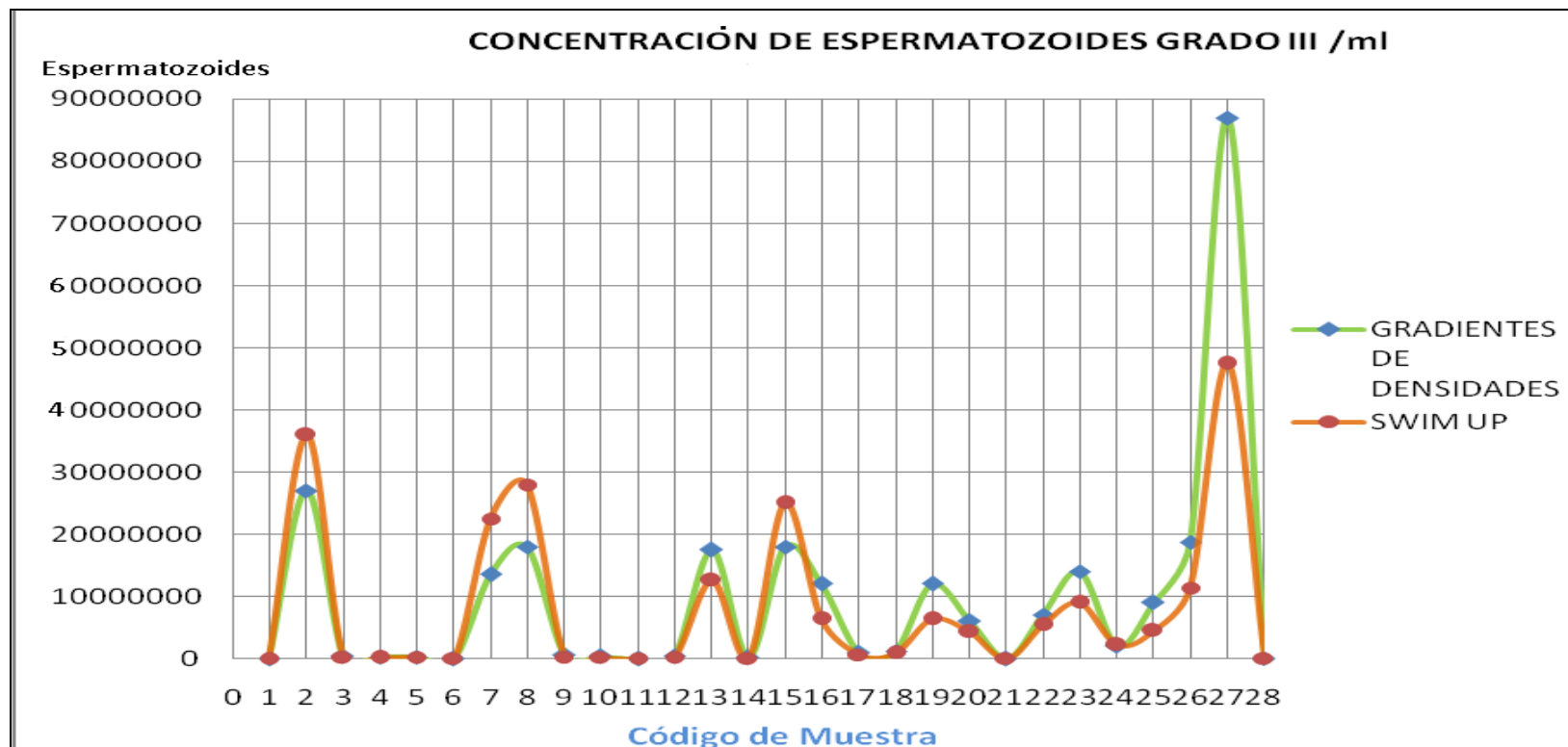


Autor: Verónica Auquilla.
Fuente: Tabla N° 15 y 16.

Las figuras N° 13 y 14 ilustran la clasificación de las muestras de semen analizadas según la calidad expresadas en número de casos y su respectivo porcentaje. Así encontramos que 9 muestras (32%) corresponden a espermatozoides con características normozoospermicas, 12 casos (43%) como astenozoospermicas y 7 casos (25%) como oligoastenozoospermicas.



Figura N°15. Concentración grado III (espermatozoides/ ml) post capacitancia espermática



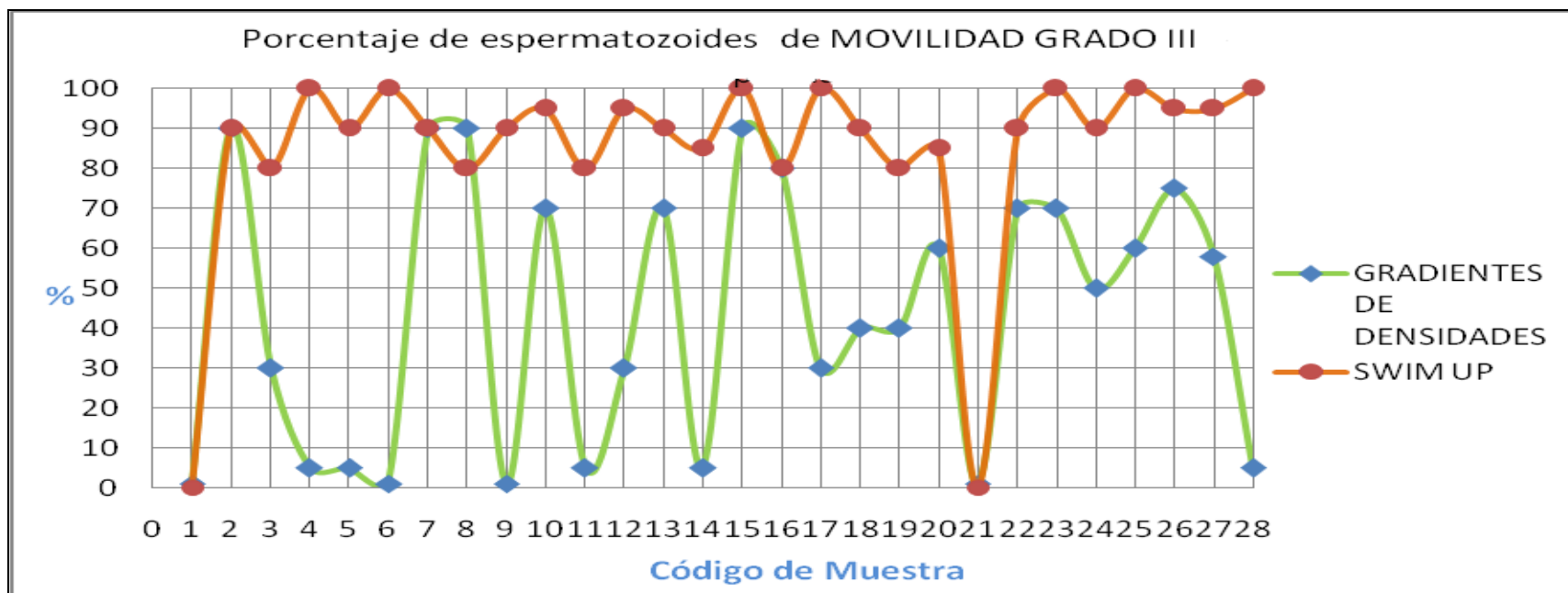
Autor: Verónica Auquilla

Fuente: Tabla N° 16.

En la gráfica adjunta se muestran los resultados de concentración de espermatozoides grado III/mililitro post capacitancia espermática; donde la mayoría de muestras de semen tratadas por el método Gradientes de densidades superan al Swim Up.



Figura Nº 16. Movilidad grado III (espermatozoides/ ml) post capacitancia espermática



Autor: Verónica Auquilla

Fuente: Tabla Nº 18.

En la gráfica adjunta, la técnica Swim Up enseña una marcada tendencia de la distribución de los datos de movilidad grado III obtenidos, en comparación con la de gradientes de densidades que presenta gran variabilidad. Además es visible que con Swim Up, se obtiene un mayor % de Motilidad grado III, con respecto a la técnica de Gradientes.



Tabla Nº 18: Cuadro de desempeño de la técnica gradientes de densidades vs Swim Up; según la concentración de

CONCENTRACIÓN	Tipo de Semen	NORMO ZOOSPÉRMICAS		OLIGOASTENO ZOOSPÉRMICAS		ASTENO ZOOSPÉRMICAS		TOTAL	
	Tipo de técnica	Nº Casos	%	Nº Casos	%	Nº Casos	%	Nº Casos	%
	Gradientes	5	56	5	71	11	92	21	75
	Swim Up	4	44	-	-	1	8	5	18
	No Recuperación	-	-	2	28	-	-	2	7
	Total	9	100	7	100	12	100	28	100
MOVILIDAD	Gradientes	1	11	2	29	-	-	3	11
	Swim Up	5	56	5	71	12	100	22	78
	Equitativo	3	33	-	-	-	-	3	11
	Total	9	100	7	100	12	100	28	100
% RECUPERACIÓN	Gradientes	6	67	7	100	11	92	24	86
	Swim Up	3	33	-	-	1	8	4	14
	Total	9	100	7	100	12	100	28	100

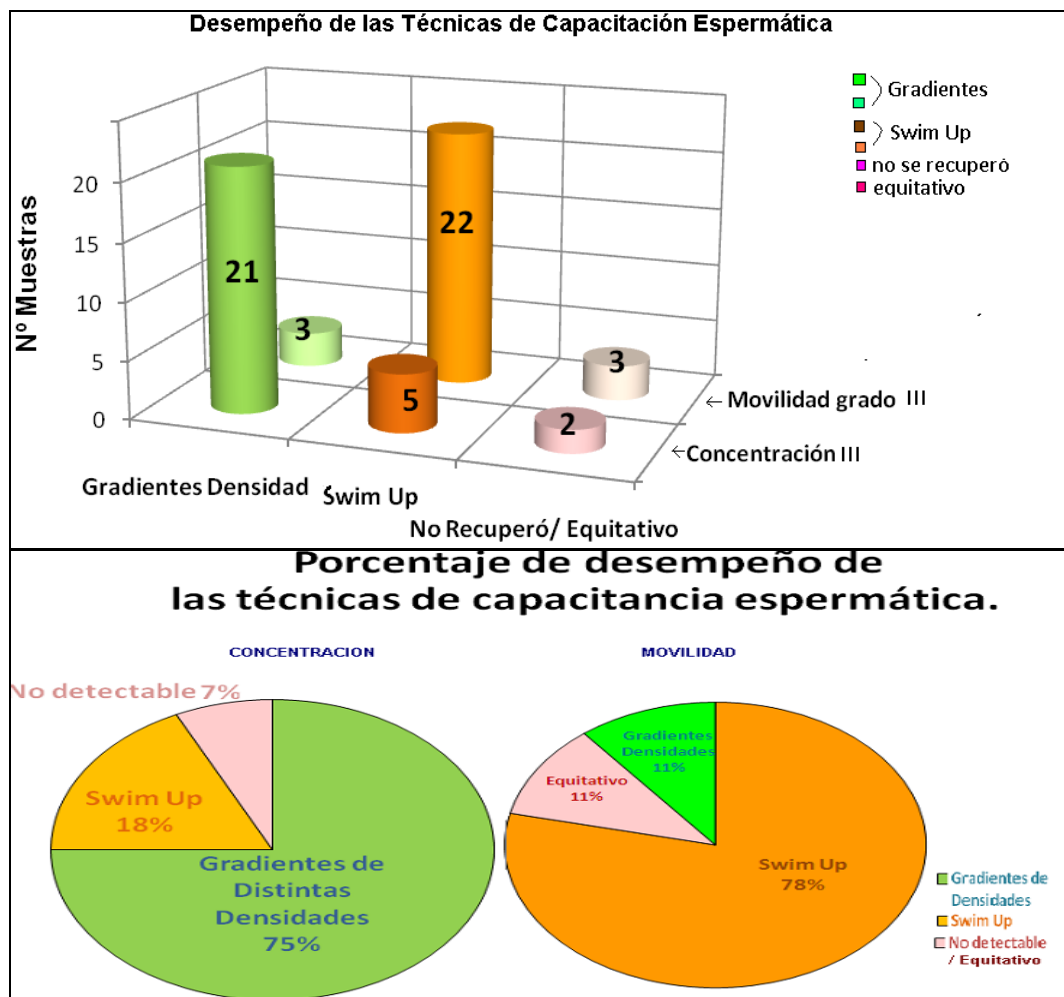
espermatozoides grado III/ ml

Autor: Verónica Auquilla

Fuente: tabla Nº 16-18-19-20



Figuras Nº 17 y 18: Comparación del desempeño de las técnicas de capacitancia espermática según la concentración y movilidad grado III expresada en número y porcentaje de casos.



Autor: Verónica Auquilla

Fuente: tabla Nº 16-18

Las gráficas anteriores muestran la concentración grado III según el número y porcentaje de muestras respectivamente, en donde se evidencia que del total de casos; 5 (18%) presentan mejor rendimiento con la técnica Swim Up, 21 casos (75%) con la de gradientes de densidades y 2 casos (7%) en los que no se recuperó espermatozoides por ninguna de las dos técnicas.

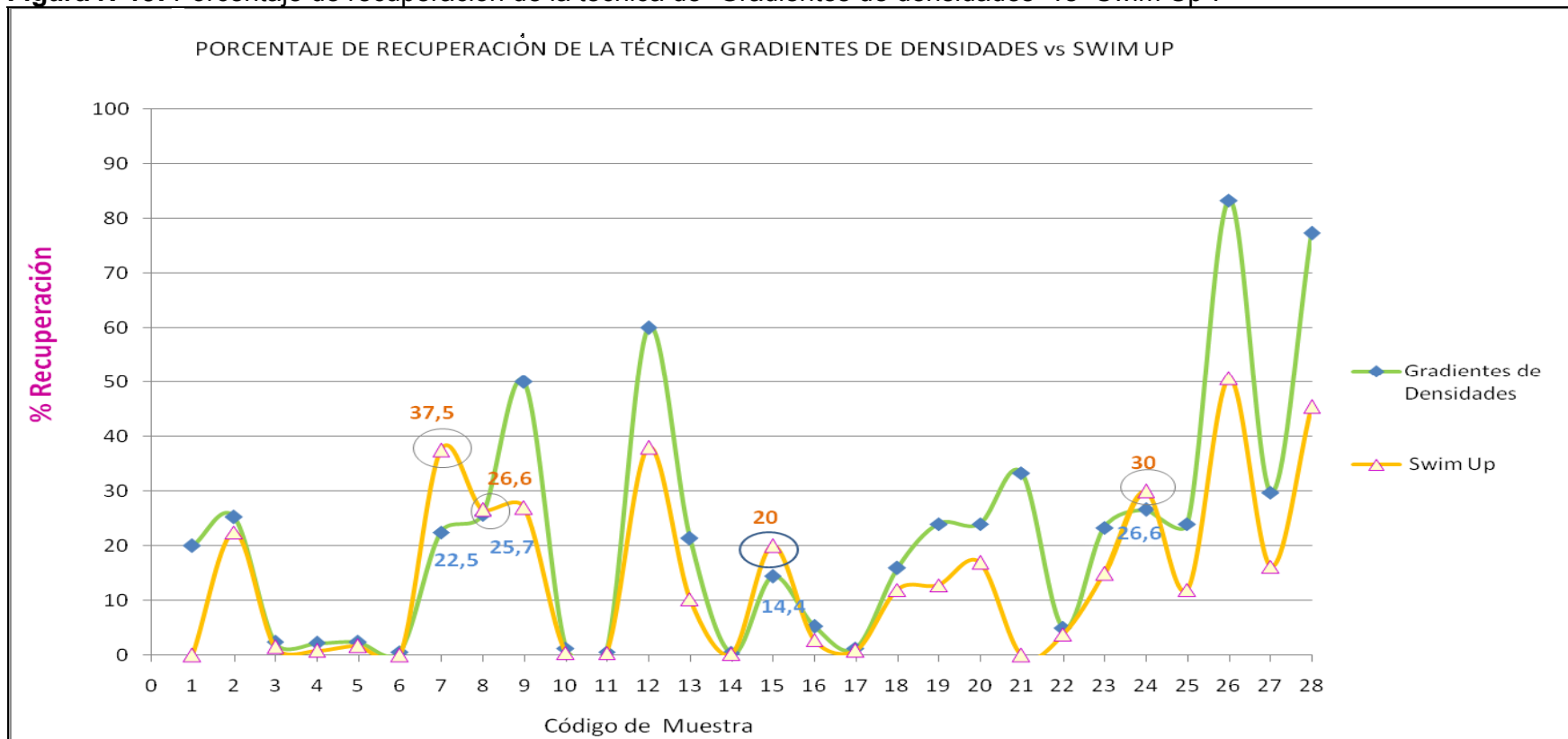
Al igual se observan que con la técnica Swim Up el 78 % de las muestras, presentan mayor porcentaje de movilidad grado III, alcanzándose mejores



resultados con esta técnica en comparación con la de gradientes cuyo porcentaje de recuperación es del 11%.



Figura N°19: Porcentaje de recuperación de la técnica de "Gradientes de densidades" vs "Swim Up".

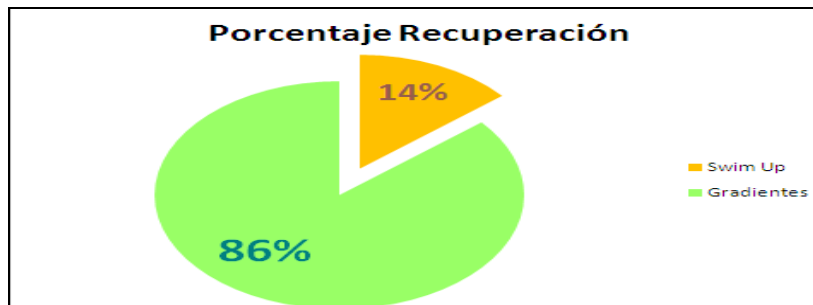


Autor: Verónica Auquilla

Fuente: tabla N° 17.



Figura N°20: Porcentaje de recuperación de la técnica "Gradientes de densidades" vs "Swim Up"



Autor: Verónica Auquilla
Fuente: tabla N° 18.

En las gráficas anteriores se observa que con la técnica Gradientes de densidades se recupera mayor porcentaje de espermatozoides grado III (86% que corresponde a 24 muestras, a diferencia de la técnica Swim Up, que con solo 4 muestras (14%) supera a la de Gradientes. Siendo más efectiva la técnica de gradiente de densidades.

Figura N° 21: Porcentaje de recuperación de la técnica de "Gradientes de densidades" vs "Swim Up", según la calidad de semen.



Autor: Verónica Auquilla
Fuente: tabla N° 18.

La gráfica ilustra una alta tasa de recuperación de espermatozoides grado III con la técnica de gradientes de densidades para los tres tipos de semen; siendo la más relevante sobre muestras oligoastenoospermicas con el 100%. Paradójicamente a lo que ocurre con la técnica Swim Up, aunque cabe



mencionar que sobre las muestras normozoospermicas mostró un buen comportamiento (33%).

3.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Hipótesis planteada: $H_0 \geq H$

Si: H_0 = Técnica Swim Up

H = Técnica gradientes de densidades

El análisis estadístico realizado en esta investigación de resultados cuantitativos es la prueba F Sedenecor.

Prueba F Sedenecor: Si $F_{cal} \geq F_{crit}$ acepta la hipótesis, pero Si $F_{cal} < F_{crit}$ se rechaza la hipótesis

Para la prueba F se calcula:

- Las varianzas de cada técnica σ_1^2 y σ_2^2
- El estadístico Fcal apartir de la siguiente fórmula:

$$F_{cal} = \sigma_{mayor}^2 / \sigma_{menor}^2$$
- Grados de libertad: (n_1-1) , (n_2-1) (n_1 tamaño de la muestra de varianza mayor y n_2 tamaño de la muestra de varianza menor).
- F crítico= 2,51 según tablas preestablecidas y con un nivel de confianza 99%.⁵⁸

Tabla N°19. Resultados obtenidos con el programa Excel 2007 para Prueba F

σ^2_1 Gradientes	σ^2_2 Swim Up	Grados libertad 1	Grados libertad 2	Fcal	Fcrit
494,415626	229,7441611	27	27	2,15	2,51

Autor: Verónica Auquilla

Fuente: tabla N° 20.

Según los datos obtenidos del estudio $f_{cal} < f_{crit}$, por lo que se rechaza la hipótesis.

En nuestro estudio se determinó, que de 28 muestras de semen capacitadas por los dos métodos, solo un 14%(4 casos) resultó con mejor recuperación de

⁵⁸ ZAR, JH.,(1996) Bioestadistical Analisis. 3rd Edition. Prentice –Hall International, London.



espermatozoides grado III para la técnica Swim Up y el restante (86%) se acreditó a la técnica de Gradientes de densidades que la consolida como la más idónea para capacitar muestras de diversa naturaleza.

3.4 DISCUSIÓN

Independientemente de que los métodos de recuperación de espermatozoides, permiten seleccionar los gametos con excelente poder fecundante y concentrar los espermatozoides con mayor aptitud para fecundar los ovocitos, en este estudio fruto de la aplicación de las técnicas "Gradiente de densidades" y "Swim Up" se han encontrado ventajas y desventajas para cada una de ellas.

Si bien la técnica de gradientes permite recuperar muestras con mayor densidad espermática, siendo una solución coloidal de partículas de sílice revestidas en polivinilpirrolidona, por lo cual no es inerte, puede desencadenar una reacción inflamatoria si no se elimina por completo de la suspensión espermática, antes de una inseminación intrauterina. Sumado a esto se requiere precisión y cuidado en la preparación de las gradientes, que de cumplirse satisfactoriamente este hecho podría utilizarse para "rescatar" muestras de semen de mala calidad (oligo y astenozoospermicas), no aptas para el *swim-up*, mostrando excelentes resultados.

El *swim-up* es un método sencillo y de bajo costo, que evita la exposición de células humanas a reactivos cuyos efectos a largo plazo no son conocidos permitiendo recuperar del semen los espermatozoides con características traslativas y estructurales de mejor calidad. De acuerdo a nuestros resultados la principal desventaja del método consiste en la baja tasa de recuperación, aunque es el método de elección para muestras normozoospermicas empleadas en cualquiera de las técnicas de reproducción asistida (IAI, FIV, ICSI).

La presente investigación, debido al tiempo, bajo número de sujetos participantes y costos del estudio, probablemente subestima los resultados de



desempeño de las técnicas aplicadas, ya sea acreditando o desmereciendo el título de "Mejor Técnica de Capacitación Espermática".

Si consideramos que el semen es un vehículo de transmisión de la infección por VIH, que debido a varios aspectos no siempre es posible detectarlo a tiempo en todos los individuos infectados y que el lavado de semen se apoya en la hipótesis de que el virus no esté presente en los espermatozoides, pero sí en el plasma seminal y en las células no espermáticas con receptores CD4 (linfocitos T y macrófagos). Es necesario optar por un lavado de semen en el que se aplique un doble proceso (Gradientes y Swim Up) aprovechando de sus propiedades y beneficios en forma conjunta, aunque esto represente un costo más elevado a la pareja.

Se sabe que hoy en día existe una alta prevalencia de infecciones por VIH, por lo que estudios de este tipo proporcionan el conocimiento esencial para la creación de estrategias en el cuidado de la salud con el propósito de garantizar mejores resultados para los pacientes que se someten a estas técnicas de reproducción.

De acuerdo a la revisión de Dodson y Posada en la que compararon la técnica de gradiente versus la técnica de "swim-up", los autores llegaron a la conclusión de que: No hay pruebas suficientes para recomendar alguna técnica de preparación específica. Se necesitan ensayos controlados aleatorios amplios, de alta calidad que comparen la efectividad de una técnica de gradiente y/o de "swim-up" en el resultado clínico.

Según la revisión de GORUS FK, la técnica de gradientes actúa como filtro para el plasma seminal, células redondas, detritos y aquellos espermatozoides con movilidad no progresiva. Además permite una mejor recuperación de espermatozoides móviles en las muestras oligoastenozoospermicas y astenozoospermicas.

Según la revisión de HARRIS SJ y colb la técnica swim up permite una buena recuperación en las muestras normozoospermicas.

Estas dos últimas revisiones corroboran los resultados de mi trabajo de tesis.



3.5 CONCLUSIONES

La clasificación de las muestras según la calidad de semen expresa que de 28 pacientes (100%), 19 de ellos (58%), presentaron alteraciones en la concentración, movilidad y vitalidad de los espermatozoides, justificando quizá que estos hallazgos sean la causa principal ó secundaria de infertilidad. Además esta categorización permite definir la técnica de capacitación a emplearse en cada caso para aplicaciones posteriores.

Esta tesis se puede resumir en tres relaciones básicas:

Con respecto a concentración grado III: la técnica "Gradientes de densidades" con 21 muestras (75%) superó a "Swim Up", que contó tan solo con 5 muestras (18%); donde sus concentraciones fueron mayores que con la técnica anterior.

Con respecto a movilidad grado III: La técnica "Swim Up" demostró ser eficaz para selección exclusiva de espermatozoides con movimiento progresivo rápido evidenciado con 22 de 28 muestras (78%), en las que el porcentaje de movilidad III estuvo por encima del 80% de la concentración total de espermatozoides hallada, diferente a la de "Gradientes", que únicamente sobre 3 muestras (11%) mostró una leve superioridad. Cabe mencionar que esta no es eficiente para recuperar espermatozoides con movimiento progresivo rápido, connotación debida a la gran variabilidad de porcentajes de movilidad III obtenidos; expresado por la coexistencia de un alto porcentaje de espermatozoides con otro tipo de movilidad o incluso inmóviles.

Con respecto a porcentaje de recuperación de espermatozoides grado III: En las muestras oligoastenozoospermicas la técnica "Gradientes" manifestó la tasa máxima de recuperación; en las muestras astenozoospermicas y normozoospermicas se recuperó un 92% y 67% respectivamente, aunque esta última no presentó diferencia significativa con respecto a la técnica "Swim Up".



Las gradientes de densidades sirven para recuperar más espermatozoides de pacientes con oligo y astenozoospermia, a pesar de que los espermatozoides recuperados por migración ascendente parecen tener mejor movilidad, aun cuando el rendimiento sea menor. Sumado a este hecho los datos estadísticos corroboran a que la elección del método de recuperación está condicionada por la concentración total de espermatozoides y por el grado de movilidad de la muestra inicial de semen.

Después de haber realizado el estudio andrológico enfocado a la capacitancia espermática de muestras de semen procedentes de pacientes de la clínica Bio GEPA, se responde a la hipótesis planteada: con la técnica "Swim Up" no se recuperó igual, ni mayor porcentaje de espermatozoides con movimiento progresivo rápido, que con respecto a la de "gradientes de densidades".



3.6 RECOMENDACIONES

Luego de realizado mi trabajo de investigación hago las siguientes recomendaciones:

- Realizar una oportuna calibración de equipos para evitar la alteración en la morfología de los espermatozoides, el paso de sustancias o células diferentes de los espermatozoides que presentan movilidad grado III.
- Evitar romper las fases de las gradientes para obtener separaciones adecuadas de los componentes de las mezclas en la técnica de gradientes, que se ve reflejado en fracciones mucho más limpias al aislar otros residuos. Si en la muestra a capacitar existen cuerpos gelatinosos, al ser más densos y de gran tamaño frente a los espermatozoides, pueden romper las capas del gradiente durante la centrifugación y facilitar el paso de componentes no deseados hacia el fondo del tubo disminuyendo considerablemente la eficacia de la capacitación, por lo que se considera que de hallar estos cuerpos en una muestra para capacitancia debe preferirse la técnica Swim Up.
- Usar varios tubos para recuperación de espermatozoides, si la técnica a emplear es Swim Up, e incrementar el tiempo de incubación y el ángulo de inclinación del tubo de cultivo debido a la baja tasa de recuperación que se logra con esta técnica.
- Para un estudio integral acerca de las técnicas sería conveniente realizar investigaciones similares que incluyan un número mayor de pacientes varones y el respectivo seguimiento de la pareja hasta el embarazo.



4. BIBLIOGRAFÍA Y REFERENCIAS

- ¹ VANRELL Joan Antoni, CALAF Joaquín, BALASCH Joan, VISCASILLAS Peren (1992), "Fertilidad y Esterilidad Humanas". Ediciones Científicas y Técnicas, Barcelona- España; cap 1
- ² HORTON Marcos (2007); "Curso Superior Reproducción Humana" EPIDEMIOLOGIA DE LA INFERTILIDAD. Disponible en: <http://www.EPIDEMIOLOGIA DE LA INFERTILIDAD pdf. SAMeR> [23 /06/10]
- ³ VALENCIA Iván (2002), Infertilidad, "Tratado de Reproducción Humana" Editorial Masson -Elsevier, España. Disponible en: Http://www.redlara.com/esp/PEC_DAT_LIVRO_IVAN_INDICE.ASP [23/07/10]
- ⁴ VALENCIA Iván (2002), Aspectos clínicos de la infertilidad. "Reproducción Humana e Infertilidad" Quito: Imp. Boutique Creativa. Noviembre. Cap, 1 y 2
- ⁵ URBINA, LERNER, BIBER (2008), "Fertilidad y Reproducción Asistida". Editorial Panamericana, Caracas– Venezuela, cap 9 -17.
- ⁶ URBINA, LERNER, BIBER (2008). "Fertilidad y Reproducción Asistida". Editorial Panamericana, Caracas- Venezuela, pag 18-40.
- ⁷ Instituto Márquez (2003), Factores para valorar el semen. Disponible en http://www.institutomarques.com/estudio_semen_factores.html [23/07/2010]
- ⁸ OMS .Cambridge University Press (1994). "Manual de Laboratorio de la OMS para el examen del semen humano y de la interacción entre el semen y el moco cervical". Editorial Médica Panamericana S.A, 3º edición. Buenos Aires.
- ⁹ Fertilización – Cultek. Disponible en http://www.cultek.com/aplicaciones.asp?p=Aplicacion_FIV_DGP&opc=introduccion [21/08/10]
- ¹⁰ URBINA, LERNER, BIBER (2008). "Fertilidad y Reproducción Asistida". Editorial Panamericana, Caracas- Venezuela, cap 32,33, 34.
- ¹¹ HONORABLE CÁMARA DE DIPUTADOS DE LA NACIÓN. (2010) "Accesibilidad y regulación de las técnicas de reproducción humana asistida", Buenos Aires. Disponible en www.xxxx-D-2010-reproduccionhumanaasistida.pdf [23/07/10].
- ¹² SABINA DE VICENTIIS. Manual de procedimientos del Laboratorio de Reproducción Asistida. Buenos Aires: CEGYR.



- ¹³ URBINA, LERNER, BIBER (2008). "Fertilidad y Reproducción Asistida". Editorial Panamericana, Caracas- Venezuela, cap 30,31,32.
- ¹⁴ REMOHÍ J, COBO A, ROMERO J, M.J de los SANTOS, PELLICER A (2007), " Manual práctico de esterilidad y reproducción Humana". Editorial Mc Graw Hill-Interamericana, 3º Edición, Cap 1, 2, 3.
- ¹⁵ VANRELL Joan Antoni, CALAF Joaquín, BALASCH Joan, VISCASILLAS Peren(1992), "Fertilidad y Esterilidad Humanas". Ediciones Científicas y Técnicas, Barcelona- España; cap 28
- ¹⁶ VANRELL Joan Antoni, CALAF Joaquín, BALASCH Joan, VISCASILLAS Peren (1992), "Fertilidad y Esterilidad Humanas". Ediciones Científicas y Técnicas, Barcelona- España; cap 29
- ¹⁷ CÁNOVAS BERNABÉ Sebastián (2007), "Interacciones homólogas y heterólogas *in vitro* de gametos porcinos, bovinos y humanos, y sus aplicaciones en el estudio de la fecundación", Murcia. Disponible en http://www.tdr.cesca.es/TESIS_UM/AVAILABLE/TDR-0906107-104739/Canovas07de14Discusion-conclusiones.PDF [23/07/10].
- ¹⁸ URBINA, LERNER, BIBER (2008). "Fertilidad y Reproducción Asistida". Editorial Panamericana, Caracas- Venezuela, cap 34
- ¹⁹ PASQUALINI Sergio (2010), "Técnicas de fertilización". Disponible en <http://www.bebesenlaweb.com.ar/elembarazoyvos/preconcepcion/tecnicasfertiliza.html> [23/07/10]
- ²⁰ Producción in vitro de embriones (Abril 2002). Disponible en: <http://canal-h.net/webs/sgonzalez002/Manipulacion/PRODUCCION.htm> [23/07/10]
- ²¹ CARRAZCO VILLAMIZAR (2007) Luis. "Actividad de siete exoglicosidasas, concentración de proteínas y cambios de volumen en el fluido oviductual de las especies bovina y porcina a lo largo del ciclo estral. Murcia. Disponible en: http://www.tdr.cesca.es/TESIS_UM/AVAILABLE/TDR-0125108-094357/CarrascoVillamizar01de18.pdf [23/07/10]
- ²² PALMA Gustavo (1986). "Biotecnología de la reproducción". Disponible en http://www.reprobiotec.com/transporte_espermatico.html [5/08/10].
- ²³ ODEBLAD (2010), "Verificación científica del método de la ovulación por el doctor Erik Odeblad". Disponible en <http://www.familiadelasamericas.org/index/scientific-verification-of-the-ovulation-method-by-dr-erik-odeblad>. [23/07/10]
- ²⁴ ARANDA Vet, BRAVE Vet, CASAGRANDE Vet. INTA (2002). "Colesterol EN Bovinos". Disponible en http://www.produccion-animal.com.ar/informacion_tecnica/carne_y_subproductos/26-colesterol_en_bovinos.pdf [12/06/10]



- ²⁵ CARRAZCO VILLAMIZAR Luis (2007). "Actividad de siete exoglicosidasas, concentración de proteínas y cambios de volumen en el fluido oviductual de las especies bovina y porcina a lo largo del ciclo estral". Murcia. Disponible en: http://www.tdr.cesca.es/TESIS_UM/AVAILABLE/TDR-0125108-094357//CarrascoVillamizar02de18.pdf [23/07/10]
- ²⁶ ANZALDÚA Santiago, PÉREZ Mario, CERBÓN Marco, CAMACHO Ignacio(2003). "Actividad secretora del oviducto de mamíferos domésticos durante la fertilización y el desarrollo embrionario temprano" Disponible en <http://www.fmvz.unam.mx/fmvz/cienciavet/revistas/CVvol9/CVv9c8.pdf> [15/06/10]
- ²⁷ GUTIERREZ G (2009), "Aparato reproductor femenino", Equipo Biología.. Disponible en <http://equipobiologia.blogspot.com/> [25/06/10]
- ²⁸ PALOMO María (1995). "Efecto del tratamiento de los espermatozoides sobre la fecundación in vitro en el caprino". Disponible en http://www.tesisenxarxa.net/TESIS_UAB/AVAILABLE/TDX-0629109-154131//TMJPP1de2.pdf [15/06/10]
- ²⁹ LANGMAN Sadler (2006), "Embriología Médica con Orientación Clínica", Editorial panamericana, 10º edición, Madrid- España, Cap 2.
- ³⁰ VANRELL Joan Antoni, CALAF Joaquín, BALASCH Joan, VISCASILLAS Peren (1992), "Fertilidad y Esterilidad Humanas". Ediciones Científicas y Técnicas, Barcelona- España; cap 4,5.
- ³¹ URDAPILLETA Leticia (2008). "Selección espermática- la lucha por la sobrevivencia". Disponible en <http://munlait.wordpress.com/2008/09/21/selección-espermatica-la-lucha-por-la-supervivencia-i/> [6/06/10]
- ³² MERINO Ricardo (2003). "Universidad austral de chile- facultad de ciencias veterinarias-instituto de reproducción animal- estudios preliminares en capacitación in-vitro de espermatozoides ovinos frescos y congelados" valdivia-chile. Disponible en www.fvm562e.pdf [23/07/10]
- ³³ MATÁS, GARCÍA, SANSEGUNDO, GADEA, COY, RUIZ (2007). "Estudio de la capacitación espermática *in vitro* en espermatozoides eyaculados y epididimarios". Dpto. Fisiología, Facultad de Veterinaria, Universidad de Murcia. Disponible en <http://www.um.es/grupo-fisiovet> [23/07/10]
- ³⁴ BOARELLI y colb. (2007) Vol 03, Nº 2. "Revista médica universitaria UN-Cuyo". Detección de la capacitación espermática basada en la visualización de los componentes lipídicos de microdominios de membrana. Disponible en http://www.vol03_02_art04.pdf [12/06/10]
- ³⁵ E.R.S. ROLDAN. (2009) "Preparación de los espermatozoides para la fecundación en mamíferos". Madrid. Disponible en



<http://www.ovinoscaprinos.com.ar/FERTILIDAD/Preparacion%20de%20los%20espermatozoides.pdf> [12/06/10]

³⁶Austin CR (1985). En: Biology of Fertilization (CB Metz, A Monroy, eds.). Academic Press, New York, vol. 2, pp. 121-155. Disponible en www.anatomohistologia.uns.edu.ar/plantilla.asp?zona [23/07/10]

³⁷VALDEBENITO, C FLETCHER, V VERA, J FERNÁNDEZ (2009), Physical-chemical factors that regulate spermatid motility in fish: basic and applied aspects. Disponible en http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:TczyL4nOpHEJ:www.scielo.cl/scielo.php%3Fpid%3DS0301-732X2009000200002%26script%3Dsci_arttext+MOVILIDAD+DE+LOS+ESPERMATOZOIDES+HUMANOS+EN+MEDIOS+ACUOSOS&cd=3&hl=es&ct=clnk&gI=ec ó www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0301...script [12/06/10]

³⁸ALLENDE R. "La vida del espermatozoide después de la espermatogénesis". Disponible en http://www.ciavt.com.ar/insumos/articulos_tecnicos/vida_esperma.pdf. [23/07/10]

³⁹AIMALE y col, Anátomo-Histología - Módulos: Aparato Reproductor Disponible en <http://www.anatomohistologia.uns.edu.ar/plantilla.asp?zona=modrepro>. [12/06/10]

⁴⁰ TABARES y col (julio 2005)", Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias", Fisiología de la activación del espermatozoide en peces de agua dulce, vol18 N° 2, Medellín. Disponible en www.scielo.unal.edu.co/scielo.php?script=sci...es. [12/06/10]

⁴¹ YANAGIMACHI, R (1994). The Physiology of Reproduction, Editorial Raven, Nueva York. Cap 1,2,3.

⁴²BALDI E, LUCONI M, BONACCORSI L, KRAUSZ C Y FORTI G(1996). "Human sperm activation during capacitation and acrosome reaction: role of calcium, protein phosphorylation and lipid remodelling pathways". Disponible en [Http://www.HUMAN_SPERM_ACTIVATION_DURING_CAPACITATION](http://www.HUMAN_SPERM_ACTIVATION_DURING_CAPACITATION) [1].PDF ó www.bioscience.org/1996/v1/d/baldi1/htmls/baldi.pdf [23/08/10].

⁴³DARSZON Alberto (2008). "Canales, iones y como el espermatozoide interpreta los mensajes del óvulo. Disponible en www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/libro_25.../capitulo_03.pdf. [20/05/10]

⁴⁴Capacitación Espermática en el proceso reproductivo. Disponible en http://mundo-pecuario.com/tema171/fertilizacion/capacitacion_espermatoca-807.html [15/07/10]



- ⁴⁵Yanagimachi R. (1994), "Mammalian fertilization. In: Physiology of Reproduction". Eds: Knobil E., Neill J. Raven Press, New York. Pag 189-317
- ⁴⁶MARTÍNEZ Belén (2002). "Estudio de fecundación *in vitro* en porcino: reducción de la poliespermia y optimización de la producción *in vitro* de embriones". Madrid. Disponible en <http://eprints.ucm.es/tesis/vet/ucm-t26293.pdf>. [23/07/10]
- ⁴⁷ÁLVAREZ Juan. "Cambios espermáticos previos a la fecundación". Barcelona. Disponible en [http://www.woombeuskadi.org/symposium/ponencias/15_juan_alvarez\(cambios_espermaticos\).pdf](http://www.woombeuskadi.org/symposium/ponencias/15_juan_alvarez(cambios_espermaticos).pdf)[13/07/10]
- ⁴⁸ OLIVERA Martha y colb(Octubre/diciembre 2006)" Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias" El espermatozoide, desde la eyaculación hasta la fertilización, vol.19 no.4 Medellín. Disponible en <http://www.scribd.com/doc/15280348/Fecundacion>.,www.scielo.unal.edu.co/scielo.php [26/06/10]
- ⁴⁹ URBINA, LERNER, BIBER (2008). "Fertilidad y Reproducción Asistida". Editorial Panamericana, Caracas- Venezuela, cap 46.
- ⁵⁰ MARTÍNEZ Belén (2002), "Estudio de la fecundación "in vitro" en porcino: reducción de la poliespermia y optimización de la producción "in vitro" de embriones", Madrid. Disponible en <http://ucm-t26293.pdf>
- ⁵¹Técnicas Galeón- Centrifugación, disponible en <http://www.galeon.com/lactobacilo/tecnicas.htm>. [23/08/10]
- ⁵²Cole-Parmer Technical Library, Conceptos básicos de centrifugación, disponible en http://www.coleparmer.com/techinfo/techinfo.asp?htmlfile=basiccentrifugation_SP.htm&ID=910. [22/08/10]
- ⁵³CIGOR, Reproducción asistida, Método de separación de los espermatozoides móviles. Disponible en http://www.cigorcentro.com.ar/index.php?s=lab_proced_muestras. [23/08/10].
- ⁵⁴PAMA Gustavo A (2010.) Técnicas de capacitación espermática, Disponible en www.procrear.com.pe/fertilab.php[22/08/10]
- ⁵⁵PALMA Gustavo A (2001), Biotecnología de la reproducción- principios de Swim Up, Ediciones: instituto nacional de tecnología agropecuaria, Argentina, 1ªedición, pag 240-260.
- ⁵⁶An IVFonline Company (2010), All Grad. Disponible en http://www.lifeglobal.com/assets/PDF/AG-Broch-Mar12_2010.pdf. [22/08/10]



⁵⁷ NÚÑEZ ACEVEDO Néstor, Capacitación de espermatozoides. Disponible en http://distritos.telepolis.com/1417/lib/Infertilidad_masculina/capacitacion.htm [22/08/10]

⁵⁸ AR, JH.,(1996), "Bioestadistical Analisis". 3rd Edition. Prentice –Hall International, London.



ANEXOS

ANEXO Nº 1 INSTITUTO BIOGEP LABORATORIO DE ANDROLOGIA ESPERMATOGRAMA

Fecha.....
Sr.....
Sra.....
Días de abstinencia.....
Lugar de recolección.....
Medico.....
Observaciones.....

SEMEN

Volumen..... pH.....
Consistencia:.....
Aglutinación:..... % Debris..... %
Concentración/ml:.....
Células redondas:.....
Viabilidad:.....

%Motilidad: Grado 0:
 Grado I:
 Grado II:
 Grado III:
Morfología: Normales:.....% Anormales..... %
Normales:
Microcéfalos:
Piriformes:
Puntiagudos:
Macrocéfalos:
Bicéfalos:
Bicaudados: CAPACITADA
Amorfos cabeza: Vo.....
Amorfos cola: Mov.....
Inmaduros: Grado III.....



ANEXO Nº 2
CLÍNICA DE MEDICINA REPRODUCTIVA
Y GINECOLOGÍA BioGEPA

CONSENTIMIENTO PARA EL ESTUDIO DE CAPACITANCIA
ESPERMÁTICA.

Fecha: / / 2010

Código: (.....)

Sr:

Dirección:

INFORMACIÓN

La capacitación espermática consiste en seleccionar aquellos espermatozoides con mejor movilidad mediante la eliminación del plasma seminal, y de los espermatozoides inmóviles, junto con las células inmaduras y detritos; por distintos sistemas de lavado y para posteriormente incubar los espermatozoides en medios de composición comparable a la del fluido del oviducto.

Objetivos del estudio:

*Seleccionar la mejor técnica de capacitación de espermatozoides.

*Separar los espermatozoides de buena calidad del resto de la muestra

*Valorar la capacidad de los espermatozoides para fecundar el óvulo.

Para el presente estudio se requerirá una muestra de semen, obtenido de acuerdo a los criterios expresados por el personal encargado del laboratorio de andrología, el mismo será tratado por dos técnicas diferentes de capacitación espermática llamados Swim up y gradientes de distintas densidades, que con



fundamentos diferentes buscan un mismo objetivo que es el “obtener una buena concentración de espermias móviles y de buena calidad” y finalizada la capacitancia, la muestra tendrá diferentes destinos, bien sea emplearla para el tratamiento en la técnica de reproducción asistida que haya sido asignada por el médico tratante o eliminarla adecuadamente en el caso de haber sido un exámen de diagnóstico.

Los remanentes de la muestra serán eliminados en ambos casos, sin que haya posterior almacenamiento de las muestras obtenidas.

Los resultados obtenidos del espermograma y de la capacitación espermática por dichas técnicas conducirán a una mayor y mejor apreciación diagnóstica, y así definir una técnica de reproducción asistida adecuada al problema de esterilidad de la pareja.

Beneficios:

Tener la posibilidad de que la muestra que entregó al personal del laboratorio, al ser tratada por estas técnicas de capacitancia, permita una mayor apreciación; ya sea en el diagnóstico o en el propósito del tratamiento.

Confidencialidad: El laboratorio mantendrá absoluta reserva sobre los resultados.

No se autoriza el acceso a los datos a personas distintas del propio paciente y el acceso a esta información está protegido para evitar que pueda ser usado por otras personas. Una vez que los datos hayan sido recogidos e ingresados a un computador se identificarán por un código. Si alguno de los resultados en este estudio es publicado no se incluirán los nombres de los participantes.



Autorización

Habiendo tomado conocimiento de todo lo expuesto anteriormente y respondidas satisfactoriamente todas mis preguntas, doy mi consentimiento voluntariamente a que se me realice la capacitancia espermática por las dos técnicas mencionadas.

Para constancia firmo a continuación.

Sr:Número de cédula:

Nombre del investigador:.....Firma:.....

Número de cédula:.....



ANEXO Nº 3

REACTIVOS

➤ **ALL GRAD 90% y 45%**

DESCRIPCIÓN

Estos medio son diseñados para remover espermatozoides muertos, plasma seminal, células epiteliales, leucocitos, bacterias, espermias con ADN anormal, debris y otras células espermáticas humanas anteriores a la fertilización in vitro o ICSI; además se caracteriza por su eficiencia para infecciones virales, VIH, hepatitis.

Posee una alta tasa de recuperación con excelente morfología

ALL Grad 90 Y 45% están listos para ser usado como capa inferior y superior respectivamente, se han formulado para reducir el pH y cambiar la osmolaridad durante la transferencia de muestras de espermias al siguiente medio, para evitar hiperactivación prematura y para mejorar la fertilización.

Provee glucosa como substrato energético para mantener el metabolismo celular normal y la función espermática.

Ahorra tiempo de preparación en el laboratorio, porque se ha demostrado que conserva sus propiedades para la técnica de gradientes de densidades.

Son estrictamente examinados lote por lote, no se ha detectado endotoxinas y han demostrado un desempeño excelente y son de fácil remoción cuando se enjuaga.

COMPOSICIÓN

Es una suspensión de silano recubierto de partículas de sílica en una solución acuosa que contiene:

Cloruro de sodio	Cloruro de potasio	Sulfato de magnesio
Cloruro de calcio	Fosfato de potasio	Bicarbonato de sodio
HEPES	Glucosa	Piruvato de sodio
Lactato de sodio	EDTA	



CONTROL DE CALIDAD

Test físico Químico:	Especificaciones
• pH (con equilibración justa de CO ₂)	7.2-7.6
• Osmolaridad	300-320
Test biológico:	Especificaciones
• LAL Endotoxina	<1.0 EU/ml
• Screen de bacterias	Negativo
• Screen de hongos	Negativo

PROTEÍNA SUPPLEMENT

COMPONENTES

LifeGlobal Protein Supplement contiene una concentración total de proteínas de 50 mg/ml, compuesto de 44 mg/ml albúmina sérica humana y 6 mg/ml y β -globulinas humanas, en una solución salina estéril.

GLOBAL

DESCRIPCIÓN

Global Medio es diseñado para cultivo de embriones humanos, y puede ser usado para el tratamiento de gametos humanos y embriones desde la formación de pronúcleos hasta el día 3 de desarrollo (6 células), y para cultivo desde el día 3 hasta estado de blastocisto. (Día 5)



COMPOSICIÓN

Es una suspensión de silano recubierto de partículas de sílica en una solución acuosa que contiene:

Cloruro de sodio	Cloruro de potasio	Cloruro de calcio
Fosfato de potasio	Sulfato de magnesio	Bicarbonato de sodio
Glucosa	Lactato de sodio	Piruvato de sodio
Aminoácidos	EDTA	Gentamicina
Rojo de fenol	HEPES	

CONTROL DE CALIDAD

Test físico químico	Especificación
• Ph	7.2-7.4
• Osmolaridad	260-270
Test biológicos	
• Lal Endotoxin	<0.5 EU/ml
• Test esterilidad, membrana fertilización	Negativo
1-célula ensayo en embrión de ratón (% blastocysto a 96h de cultivo después de 1h exposición)	>80%

PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS DE REACTIVOS

Leyes federales (USA) restringen su mecanismo de venta, por lo que se requiere orden de un fiscal (se vende a propietarios de licencias profesionales).

No usar para inyección

No usar el producto sí:

- El empaque del producto aparece dañado ó si el sello es roto.
- La fecha de expiración ha sido excedida.



- El producto llegó descolorido, manchado o muestra evidencia de sustancias particulares.

Tanto ALLGrad® 45 y ALLGrad® 90 contiene solo una baja concentración de bicarbonato de sodio y no debe ser gaseada con CO₂.

ALMACENAMIENTO Y CONSERVACIÓN DE REACTIVOS

Expira al año de la fecha de elaboración.

Conservar entre 2 -8°C y proteger de la luz.

Registrar en la etiqueta: fecha recibida y fecha en la que el producto es abierto.

Para evitar problemas de contaminación, practicar técnicas de asepsia y desechar cantidades mínimas de exceso de medio remanente en la botella.

Una vez abierto la botella, guardar el producto protegido de la luz, cerrando herméticamente

ANEXO Nº 4

SWIM UP

Reactivos y equipos

- Medio GLOBAL, proteína suplementada.
- Tubos de centrifugado con el fondo redondo.
- Tubos centrifugadores cónicos estériles desechables (Falcon 2075)
- Pipetas esterilizadas 1 ml
- Pipetas Pasteur esterilizadas
- Incubadora a 37°C
- Centrifugadora de banco con rotor exterior

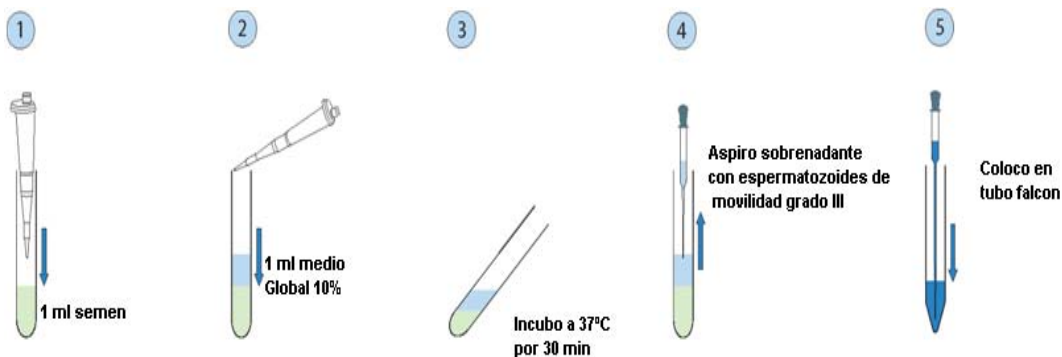
Procedimiento

Equilibrar el medio Global y la proteína suplementada a la temperatura ambiente antes de su uso.



1. Utilice una pipeta estéril para trasvasar 1 ml de de semen licuado a un tubo de aspiración estéril.
 2. Utilice una nueva pipeta estéril para poner con cuidado una capa de medio global al 10% (0,9 ml medio global con 0,1ml de proteína suplementada).
 3. Sin deshacer las capas, coloque el tubo centrifugador y su contenido en un ángulo de 45° en la incubadora a 37°C durante 30 minutos.
- Los espermias móviles migrarán hacia el medio.
4. Con cuidado extraiga con una pipeta Pasteur 0,2- 0,3 ml de la parte superior del medio (sobrenadante) que contiene espermias con movilidad grado III.
 5. Coloque estos 0,3 ml de fluido en un tubo de centrifugado de aspiración estéril.

Ahora la muestra de espermia estará lista para analizar o usar





ANEXO Nº 5

GRADIENTES DE DENSIDADES

Reactivos y equipos

- Soluciones all grad 90 y 45%, medio global 10%
- Centrifugadora
- Tubos centrifugadores cónicos estériles desechables (Falcon 2075)
- Pipetas esterilizadas de 1ml, 5ml.
- Pipetas Pasteur esterilizadas.

Procedimiento

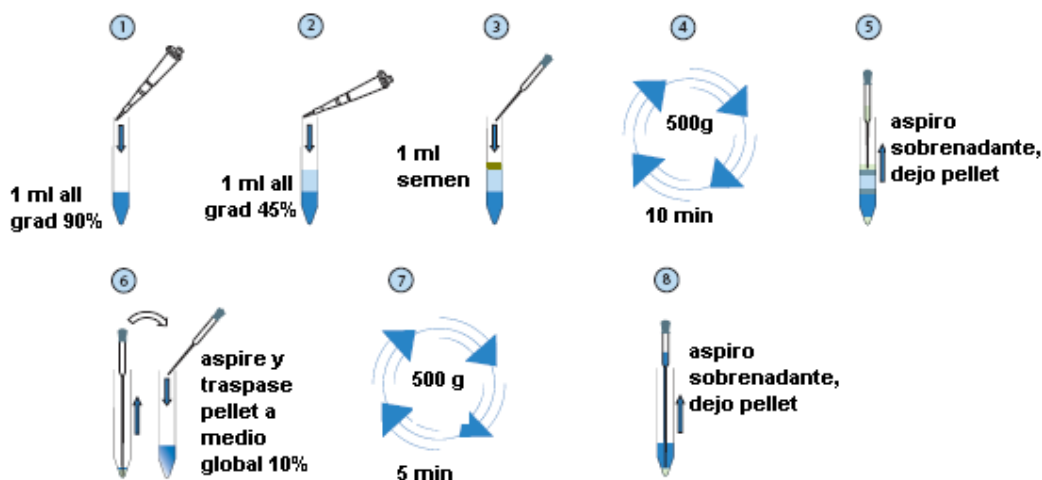
Deje reposar las soluciones hasta la temperatura ambiente.

1. Utilice una pipeta estéril para añadir 1 ml de all grad 90% a un tubo centrifugador cónico.
2. Utilice una nueva pipeta estéril para poner con cuidado una capa de 1 ml de all grad 45% sobre all grad 90%, evitando que se mezcle y rompa la interfase entre ellos.
3. Utilice una pipeta Pasteur estéril para poner con cuidado una capa de semen licuado (hasta 1,5ml) sobre los gradientes all grad.
4. Centrifugue a 500g x durante 10 minutos. No utilice el freno.
5. Utilice una nueva pipeta Pasteur estéril para aspirar todo, ejerciendo un movimiento circular desde la superficie, excepto pellets y 4-6mm de all grad 90%. Si no se ven pellets después de la centrifugación, extraiga todo el líquido excepto el inferior de 0,5 ml.



6. Utilice una nueva pipeta Pasteur estéril para aspirar los pellets (o la capa inferior del líquido de 0,5ml). Traspase los pellets de espermatozoides a un nuevo tubo y vuelva a suspender los pellets en 3ml de medio Global 10%.
7. Centrifugue a 500 x g durante 5 minutos. No utilice el freno
8. aspire el sobrenadante de medio Global dejando el menor líquido posible sobre los pellets. Si no se ven pellets, deje 0,25mL de líquido en el fondo.

Ahora la muestra de espermatozoides estará lista para analizar o utilizar.





ANEXO Nº 6
ÍNDICE DE TABLAS

Tabla Nº 1. Factores de infertilidad.

Tabla Nº 2. Valores de referencia de los parámetros seminales.

Tabla Nº3. Clasificación de las técnicas de reproducción asistida.

Tabla Nº 4. Funciones de los segmentos anatómicos de la mujer.

Tabla Nº 5. Componentes del plasma seminal.

Tabla Nº 6. Partes del espermatozoide.

Tabla Nº 7. Factores capacitantes y descapacitantes del espermatozoide.

Tabla Nº 8. Clasificación de los espermatozoides según su movilidad.

Tabla Nº 9. Resultados de la concentración espermática total pre y post capacitancia espermática.

Tabla Nº10. Resultados obtenidos con la técnica gradientes de densidades.

Tabla Nº11. Resultados obtenidos con la técnica Swim Up.

Tabla Nº 12: Resultados de concentración grado III Pre y post capacitancia espermática.

Tabla Nº13: Volumen obtenido posterior a la aplicación de las técnicas de capacitancia espermática.

Tabla Nº14: Porcentaje de Motilidad grado III pre y post capacitancia espermática.

Tabla Nº15 y 16. Clasificación de las muestras de semen según su calidad.

Tabla Nº 17. Porcentaje de recuperación de espermatozoides grado III Post capacitancia espermática, resultante de la aplicación de las dos técnicas.

Tabla Nº 18: Cuadro de desempeño de la técnica gradientes de densidades vs Swim Up; según la concentración de espermatozoides grado III/ ml.

Tabla Nº19. Resultados obtenidos con el programa Excel 2007 para Prueba F.



ANEXO Nº 7

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura Nº 1. Fotografía de un procedimiento de ICSI
- Figura Nº 2. Órganos internos del aparato reproductor femenino.
- Figura Nº 3 y 4. Estructura del espermatozoide.
- Figura Nº 5. Regiones del flagelo de un espermatozoide.
- Figura Nº 6 y 7. Estructura de la pieza media y principal respectivamente.
- Figura Nº 8. Esquema de supervivencia de los espermatozoides.
- Figura Nº 9. Morfología del espermatozoide y metabolismo energético que realiza esta célula a partir de glucosa en la pieza principal y en la pieza media.
- Figura Nº 10. Esquema de las vías de señalización inducidas en la capacitación
- Figura Nº 11. Representación de la técnica "Gradientes de densidades"
- Figura Nº 12. Representación de la técnica de capacitancia Swim up
- Figuras Nº 13 y 14. Clasificación de las muestras de semen, según el número de casos y porcentaje.
- Figura Nº15. Concentración grado III (espermatozoides/ ml) post capacitación espermática
- Figura Nº 16. Movilidad grado III (espermatozoides/ ml) post capacitación espermática.
- Figuras Nº 17 y 18: Comparación del desempeño de las técnicas de capacitación espermática según la concentración y movilidad grado III expresada en número y porcentaje de casos.
- Figura Nº19: Porcentaje de recuperación de la técnica de "Gradientes de densidades" vs "Swim Up".
- Figura Nº20: Porcentaje de recuperación de la técnica "Gradientes de densidades" vs "Swim Up".
- Figura Nº 21: Porcentaje de recuperación de la técnica de gradientes de densidades vs Swim Up, según la calidad de semen.



GLOSARIO

Acetilación: consiste en una reacción que introduce un grupo acetilo en un compuesto químico.

Acido siálico: monosacárido ácido derivado del ácido neuramínico, componente importante de las glucoproteínas.

Aciltransferasa: enzima que cataliza la transferencia del grupo funcional acilo.

Acrosina: enzima del acrosoma que facilita la penetración a la corona radiada y zona pelúcida.

Apical: este término expresa el extremo superior o punta, es lo que se sitúa hacia el extremo opuesto a la base o parte basal del órgano en cuestión .

ART: técnicas de reproducción asistida.

Axonema: Estructura contráctil de los flagelos y los cilios, formada por diez pares de microtúbulos, de los cuales uno es axial y los otros nueve están dispuestos en corona.

Esteres del forbol: son análogos de DAG y potentes promotores tumorales que causan una variedad de cambios fisiológicos, cuando son administrados a células y tejidos.

ETS: enfermedades de transmisión sexual.

Factor quiescente: Del lat. quiescens, -entis, que está quieto pudiendo tener movimiento propio.

Hipotaurina: b aminoácido azufrado, que permite mantener una motilidad espermática excelente, protege a los lípidos de la peroxidación y promueve la agregación de espermatozoides.

Histeroscopia oficial: procedimiento clínico que le permite a un ginecólogo ver el interior del útero por medio de una endoscopia.

IAI: Inseminación artificial intrauterina.

ICSI: Inyección intracitoplasmática intrauterina

MESA: aspiración microquirúrgica de espermatozoides del epidídimo.

PESA: aspiración percutánea de espermatozoides del epidídimo.



Quimiotaxis: se presenta como un proceso fisiológico, donde el glóbulo blanco combate las sustancias patógenas que han producido inflamación, este glóbulo se margina del flujo sanguíneo.

Rete testis: es una compleja organización de conductos interconectados, situados en la parte alta del testículo, recubiertos por un estroma fibroso que está en continuidad con la túnica albugínea.

Taurina: es otro de los aminoácidos considerado como "aminoácido esencial condicionado o convertible en esencial" en determinadas situaciones o etapas de nuestra vida.

Teca perinuclear: estructura única del cito-esqueleto espermático, ubicada entre la membrana acrosomal interna y la envoltura nuclear, es fundamental para la espermiogénesis y la estabilización de estructuras espermáticas.

TESE: Extracción de espermatozoides del testículo.

Transporte pasivo: es el intercambio de sustancias entre el interior celular y el exterior a través de la membrana plasmática o el movimiento de moléculas dentro de la célula.

Zona pelúcida: capa externa que rodea el ovocito de los mamíferos en el folículo de Graff, separándolo del espacio perivitelíneo.